

Dissertação de candidatura ao grau de Doutor
em Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia,
pela Universidade Nova de Lisboa,
Instituto de Higiene e Medicina Tropical.

A presente dissertação foi realizada sob a orientação da Professora Doutora Olga Maria Guerreiro de Matos, na Unidade de Protozoários Oportunistas/VIH e outras Protozooses, Unidade de Parasitologia e Microbiologia Médicas, do Instituto de Higiene e Medicina Tropical.

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Olga Matos, orientadora do presente trabalho, agradeço o apoio, a confiança depositada no meu trabalho, o estímulo e todas as oportunidades que me proporcionou. Os meus sinceros agradecimentos pelos valiosos ensinamentos e pela atenção dispensada, sem os quais não teria sido possível a elaboração desta dissertação.

Ao Professor Doutor Francisco Antunes, expresso a minha profunda gratidão pela atenção prestada, o apoio, o estímulo e o incentivo à minha formação, fundamentais para na execução do presente trabalho.

À Professora Doutora Maria Amélia Grácio, agradeço a amabilidade de ter acedido fazer parte da comissão tutorial deste trabalho de doutoramento.

Ao Professor Doutor Jorge Gaspar, o meu muito obrigada pela ajuda dedicada ao desenvolvimento das técnicas de biologia molecular.

Ao Professor Doutor Celso Cunha, e demais colaboradores da Unidade de Biologia Molecular, do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, agradeço o apoio prestado na execução das técnicas de clonagem molecular.

Ao Professor Doutor Kamal Mansinho, o meu muito obrigada pela disponibilidade e apoio prestado na recolha dos dados clínicos dos doentes.

À Professora Doutora Luzia Gonçalves, o meu reconhecimento pela disponibilidade e pelo apoio prestado, no tratamento estatístico dos dados da presente tese.

À Dr.^a Joana Cabrita, ao Eng.^o Francisco Esteves, ao Dr. Hugo Pinheiro, à Mestre Ana Lucas, à Eng.^a Cecília Silva, expresso a minha profunda gratidão pela amizade, pela disponibilidade e apoio prestado, indispensáveis na execução deste trabalho.

Aos muitos colegas que passaram pela Unidade de Protozoários Oportunistas/VIH e Outras Protozooses, em particular, à Mestre Luísa Lobo e Doutora Margarida Alves, o meu sincero obrigado pela amizade, a alegria, o apoio e o companheirismo, que transformaram os últimos quatro anos numa calma travessia.

Aos meus pais, ao Miguel, o meu muito obrigado pelo apoio, pelo carinho e pela inestimável ajuda, sem os quais seria muito difícil concluir este trabalho.

Ao Bruno, pela amizade, pelo carinho e apoio, constante e incondicional, fundamentais na passagem de mais uma etapa, o meu muito obrigado.

PUBLICAÇÕES

A partir do conjunto de resultados, apresentados nesta dissertação, foram publicados os seguintes trabalhos:

COSTA, M. C., HELWEG-LARSEN, J., ANTUNES, F., LUNDGREN, B., DIOGO, J., MATOS, O. (2001). PCR-RFLP analysis of DHPS gene for the study of resistance of *Pneumocystis carinii* to sulpha drugs in patients with co-infection PCP/HIV. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, Supl: 148S-149S.

COSTA, M. C., HELWEG-LARSEN, J., LUNGREN, B., ANTUNES, F., MATOS, O.(2003). Mutations in the dihydropteroate synthase gene of *Pneumocystis jiroveci* isolates from Portuguese patients with *Pneumocystis* Pneumonia. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22 (5): 516-520.

COSTA, M. C., GASPAR, J., RIBEIRO, C., ANTUNES, F., MATOS, O. (2003). Dihydropteroate synthase (DHPS) genotyping by PCR-RFLP analysis of *Pneumocystis jiroveci* repeated isolates from HIV-infected patients. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 50 Supl: 607-608.

COSTA, M. C., GASPAR, J., MANSINHO, K., ESTEVES, F., ANTUNES, F., MATOS, O. (2005). Detection of *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase polymorphisms in patients with *Pneumocystis* pneumonia. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 37:766-771.

COSTA, M. C., ESTEVES F., ANTUNES F., MATOS O. (2006). The genetic characterization of dihydrofolate reductase gene of *Pneumocystis jirovecii* isolates from Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (no prelo).

COSTA, M. C., ESTEVES, F., ANTUNES, F., MATOS O. (2006). Multilocus genotyping of *Pneumocystis jirovecii* in immunocompromised patients: preliminary results. *Journal of Eukaryotic Microbiology* (no prelo).

RESUMO

Pneumocystis jirovecii é um eucariota responsável por um quadro clínico de pneumonia intersticial grave em indivíduos imunocomprometidos.

Apesar do decréscimo da incidência da pneumonia por *P. jirovecii* (PPc) como resultado da introdução da profilaxia específica e da terapêutica antirretroviral potente (HAART, do inglês “Highly active antiretroviral therapy”), esta doença continua a ser uma das infecções oportunistas mais frequentes em doentes com infecção vírus da imunodeficiência humana/síndrome de imunodeficiência adquirida (VIH/SIDA) e com outras imunodeficiências. Os fármacos da família das sulfas, em especial o cotrimoxazol, uma combinação de sulfametoxazol e de trimetoprim, são considerados os agentes de primeira linha na profilaxia e no tratamento desta infecção.

Ao longo dos últimos anos, tem sido estudada a variabilidade genética da dihidropteroato sintetase (DHPS) e da dihidrofolato reductase (DHFR), duas enzimas alvo do cotrimoxazol, de *P. jirovecii* com o intuito de avaliar o possível desenvolvimento de resistência a este fármaco. Por outro lado, o estudo de outros marcadores genéticos, como as regiões dos espaçadores internos transcritos (ITS, do inglês “Internal Transcribed Spacers”), em conjunto com o DHPS e o DHFR, tem sido utilizado no sentido de melhor compreender os mecanismos de desenvolvimento de resistência ao cotrimoxazol.

Com o presente estudo, pretendeu-se efectuar a caracterização genética da DHPS, da DHFR e das regiões ITS de *P. jirovecii*, em isolados obtidos entre 1995 e 2004, em doentes imunocomprometidos. Também foi objectivo deste trabalho, estudar a relação dos

genótipos identificados nas três regiões genómicas em análise, entre si e com diversas variáveis clínicas e epidemiológicas.

Entre os 403 isolados de *P. jirovecii*, obtidos entre 2001 e 2004, a percentagem de infecção por *P. jirovecii* observada foi de 64,5%. No total, 290 isolados de *P. jirovecii* identificados no período de 2001–2004 (260 isolados) e entre 1995–2000 (30 isolados), foram submetidos ao estudo de caracterização genética, nos três *loci* em estudo.

Inicialmente, com o intuito de melhorar a técnica de amplificação do gene da DHPS de *P. jirovecii*, procedeu-se à filtração das amostras de secreções pulmonares, para remoção de DNA do hospedeiro contaminante, e foi elaborado um novo protocolo de amplificação. Apesar, de se ter verificado que o processo de microfiltração não promovia uma melhor amplificação de DNA específico de *Pneumocystis*, o protocolo de PCR “nested” desenhado contribuiu para a maior amplificação do gene da DHPS de *P. jirovecii* ($P < 0,001$).

A caracterização genética da DHPS e da DHFR, permitiu identificar o genótipo selvagem em 84,5% e 68,9%, respectivamente, dos isolados estudados. Em 15,5% dos isolados, observou-se a presença de genótipos mutantes nos codões 55 e 57 do gene da DHPS. Em relação ao gene da DHFR, 31,1% dos isolados apresentaram polimorfismos. No total, foram identificados nove locais de substituição: quatro substituições sinónimas, nas posições nucleotídicas 201, 272, 312 e 381; cinco substituições nucleotídicas não sinónimas nas posições 38, 68, 92, 154 e 200 que resultaram na alteração nos codões 13, 23, 31, 52 e 67, respectivamente. No estudo efectuado, verificou-se que as mutações do gene da DHPS, foram mais frequentes entre os isolados obtidos em 1995-2000 do que entre os isolados recolhidos entre 2001 e 2004 ($P=0,056$). Relativamente ao gene da DHFR e, em contraste com a maioria dos estudos publicados, observou-se uma elevada diversidade genética entre os isolados estudados.

Também, nas regiões ITS de *P. jirovecii*, foi observada uma elevada variabilidade entre os isolados estudados. No presente trabalho, 30 genótipos diferentes foram identificados, o que evidencia o elevado grau de diversidade genética destas regiões e a sua utilidade no estudo da transmissão e da epidemiologia da PPc. No estudo efectuado, os genótipos mais frequentes foram o Eg, o Cg e o Gg. Verificou-se que o genótipo Ne foi significativamente mais frequente entre 1995–2000 ($P=0,026$) enquanto que o genótipo Eg foi mais frequente entre 2001–2004 ($P=0,011$).

Considerando a combinação dos genótipos identificados nestas três regiões genómicas, foram observados 50 haplótipos distintos em 100 isolados de *P. jirovecii*. A elevada diversidade intra-específica observada neste estudo multilocus demonstra o potencial que esta abordagem pode ter na diferenciação de tipos *P. jirovecii* distintos e a sua utilidade no estudo da transmissão e da epidemiologia da PPc. No estudo efectuado, polimorfismos nos genes da DHPS e da DHFR, presumidamente associados à exposição ao cotrimoxazol, foram detectados em doentes não expostos a este fármaco. Esta observação pode sugerir que estas sequências polimórficas possam ser adquiridos acidentalmente, por transmissão pessoa-a-pessoa ou através de uma fonte ambiental, e não somente por pressão selectiva do cotrimoxazol. Também, a identificação de genótipos idênticos, nas três regiões genómicas em estudo, em diferentes populações de doentes sugere a ocorrência de transmissão pessoa-a-pessoa. No geral, o presente trabalho contribuiu para a clarificação do papel das mutações nos genes da DHPS e da DHFR no possível desenvolvimento de resistência ao cotrimoxazol em *P. jirovecii* assim como para a melhor compreensão da transmissão e da epidemiologia da PPc.

SUMMARY

Pneumocystis jirovecii is an eukaryote that causes severe interstitial pneumonia in immunocompromised patients. Although the widespread use of *P. jirovecii* pneumonia (PcP) chemoprophylaxis and highly active antiretroviral therapy (HAART), has reduced the incidence of this infection it remains an important opportunistic infection in acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and other immunocompromised patients. Sulpha drugs, in particular cotrimoxazole, the fixed combination of sulphamethoxazole and trimethoprim, are key agents for treatment and prophylaxis of PcP.

Over the last years, the genetic variability of *P. jirovecii* dihydropteroate synthase (DHPS) and dihydrofolate reductase (DHFR), the enzymatic targets of cotrimoxazole, has been evaluated in order to assess the potential development of resistance to this drug. Also, the study of other genetic markers, like the internal transcribed spacers (ITS) of the nuclear rRNA, together with the DHPS and DHFR genes, has been used in order to improve the knowledge on the mechanisms involved in the development of cotrimoxazole resistance in *P. jirovecii*.

In the present study, the main objective was to perform the genetic characterization of DHPS, DHFR and ITS regions of *P. jirovecii* isolates obtained between 1995 and 2004, from immunocompromised patients. Also, we intended to study the association between the genotypes identified at the three genomic regions and with several epidemiological and clinical characteristics.

Overall, among the 430 *P. jirovecii* isolates obtained between 2001 and 2004, the frequency of *P. jirovecii* infection was 64,5%. Overall, 290 *P. jirovecii* isolates, obtained in

the time periods 1995–2000 (30) and 2001–2004 (260), were submitted to the multilocus molecular characterization study.

Initially, in order to improve the amplification method of the DHPS gene, a microfiltration procedure, for the removal of human cell contamination, and a new PCR method, for amplification in specimens with low parasite load, were evaluated. Although, the microfiltration procedure did not promote the amplification of *P. jirovecii* specific DNA, a higher amplification rate of DHPS gene was obtained with the “nested” PCR method designed ($P < 0,001$).

In the present work, the genetic characterization of *P. jirovecii* DHPS and DHFR identified the wiltype genotype in 84,5% and 68,8%, respectively, of the isolates studied. In 15,5% of the isolates, the mutant genotypes at codons 55 and 57 of the DHPS gene was observed. In the DHFR gene, 31,1% of the isolates presented polymorphic sequences with a total of nine substitution sites identified. Four synonymous substitutions, at nucleotide positions 201, 272, 312 and 381 were observed. Also, five nonsynonymous substitutions at nucleotide positions 38, 68, 92, 154 and 200, that lead to amino acid alterations at codons 13, 23, 31, 52 and 67, respectively, were detected. In this study, DHPS mutant sequences were more frequent among the isolates collected between 1995 and 2000, compared with the isolates collected in the time period 2001–2004 ($P=0,056$). In the DHFR gene, a high genetic diversity was observed in the isolates studied, in contrast with other reports.

Also, in the *P. jirovecii* ITS regions, a high genetic heterogeneity was detected in the studied isolates. In the present work, 30 different genotypes were identified, which demonstrates the high genetic diversity at this *locus* and confirms their great utility in the study of PcP epidemiology and transmission. In this study, the most frequent genotypes

were Eg, Cg and Gg. Genotype Ne was significantly more frequent between 1995 and 2000 ($P=0,026$) while type Eg was more frequent in the time period 2001–2004 ($P=0,011$).

Combining the sequences identified at these three genomic regions, 50 different haplotypes were observed among 100 *P. jirovecii* isolates. The great intra-specific genetic diversity observed in the multilocus study demonstrates the potential of this analysis to distinguish different types of *P. jirovecii* and its utility in the study of PcP epidemiology and transmission. In the present study, DHPS and DHFR polymorphisms, presumably selected by cotrimoxazole pressure, were detected in immunocompromised patients not exposed to this drug. This observation may suggest that these polymorphic sequences may be incidentally acquired, by person-to person transmission or from an environmental source, and not only by drug selective pressure. Also, the observation of common genotypes, identified at the three genomic regions studied, present in different patients' populations, suggests the occurrence of person-to-person transmission.

Overall, the present work contributed to the clarification of the role of polymorphic sequences of the DHPS and DHFR in the potential development of *P. jirovecii* cotrimoxazole resistance and in the improvement of PcP epidemiology and transmission.

LISTA DE ABREVIATURAS

%	— Porcentagem
% m/v	— Porcentagem massa/volume
% v/v	— Porcentagem volume/volume
°C	— Grau Celsius
A, C, G, T	— Bases orgânicas constituintes dos nucleótidos (adenina, citosina, guanina, timina)
AcM	— Anticorpo monoclonal
ASD	— Estudo do espectro da infecção por VIH em adultos e adolescentes, do inglês “Adult and adolescent spectrum of HIV disease project”
BLAST	— sigla anglo-saxónica para “Basic Local Alignment Search Tool”
BSA	— Albumina de soro bovino, do inglês “Bovine Serum Albumine”
dATP	— 2’-desoxiadenosina 5’-trifosfato
dCTP	— 2’-desoxicitidina 5’-trifosfato
dGTP	— 2’-desoxiguanosina 5’-trifosfato
DHFR	— Dihidrofolato reductase, do inglês “Dihydrofolate Reductase”
DHPS	— Dihidropteroato sintetase, do inglês “Dihydropteroate Synthase”
DNA	— Ácido desoxiribonucleico, do inglês “Deoxyribonucleic Acid”
dNTP	— 2’-desoxinucleótido 5’-trifosfato
dTTP	— 2’-desoxitimidina 5’-trifosfato
EDTA	— Ácido etilenodiaminotetracético
EF-3	— Factor de elongação 3, do inglês “elongation factor 3”
E.U.A.	— Estados Unidos da América
FITC	— Isotiocianato de fluoresceína, do inglês “Fluoresceine Isothiocyanate”
g	— Aceleração gravitacional (unidade de força centrífuga relativa)
gpA	— Glicoproteína A
HAART	— Terapêutica anti-retroviral potente, do inglês “Highly Active Antiretroviral Therapy”
Hg	— Símbolo químico do mercúrio
IF	— Imunofluorescência

IFI	— Imunofluorescência indirecta
IgM	— Imunoglobulina M
ITS	— Espaçadores internos transcritos, do inglês “Internal Transcribed Spacers”
L	— Litro
LDH	— LDH, do inglês “lactate dehydrogenase”
M	— Molar
min.	— Minutos
ml	— Mililitro
mm³	— Milímetro cúbico
mM	— Milimolar
MSG	— Glicoproteína <i>major</i> de superfície, do inglês “Major surface glycoprotein”
mt(LSU)rRNA	Subunidade grande do RNA ribossómico mitocondrial, do inglês “mitochondrial large subunit ribosomal RNA”
mt(SSU)rRNA	subunidade pequena do RNA ribossómico mitocondrial, do inglês “mitochondrial small subunit ribosomal RNA”
N	— Número
ng/μl	— Nanograma por microlitro
nm	— Nanometro
nmol	— Nanomole
pb	— Par de bases
PBS	— Tampão fosfato salino, do inglês “Phosphate Saline Buffer”
PCR	— Reacção em cadeia da polimerase, do inglês “Polymerase Chain Reaction”
pH	— Simétrico do logaritmo decimal da concentração hidrogeniónica de uma solução ($-\log [H^+]$)
pmol	— Picomole
pp.	— Páginas
PPc	— Pneumonia por <i>Pneumocystis jirovecii</i>
PSD	— Projecto para o estudo da doença pediátrica, do inglês “Pediatric spectrum disease”
RFLP	— Polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição, do inglês “restriction fragment length polymorphism”
rRNA	— Ácido ribonucleico ribossómico, do inglês “ribosomal ribonucleic acid”

rpm	— Rotações por minuto
seg.	— Segundos
SIDA	— Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SMX	— Sulfametoxazol
TMP	— Trimetoprim
TAE	— Tampão tris–acetato–EDTA
Tris–HCl	— Tris(hidroximetilo)aminometano–ácido clorídrico
TS	— Timidilato sintetase
U	— Unidade de actividade enzimática
UV	— Ultravioleta
V	— Volt
VIH	— Vírus da Imunodeficiência Humana
µg/ml	— Micrograma por mililitro
µl	— Microlitro
µm	— Micrómetro

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos	v
Publicações	vii
Resumo	ix
Summary	xiii
Lista de abreviaturas	xvii
Índice geral	xxi
Índice de figuras	xxv
Índice de quadros	xxvii

Primeira parte – Introdução ao estudo de *Pneumocystis jirovecii* e da pneumonia por *Pneumocystis*

1. Perspectiva histórica	3
2. Morfologia	5
3. Ciclo de vida	9
4. Taxonomia	13
5. Epidemiologia da pneumocistose	19
5.1. Frequência	19
5.2. Transmissão	24
5.2.1. Modo de infecção: reactivação de infecção latente ou infecção <i>de novo</i>	26
5.2.2. Colonização por <i>P. jirovecii</i> – o estágio de portador assintomático	29
5.3. Epidemiologia molecular	31
6. Apresentação clínica pneumocistose	39
6.1. Pneumocistose pulmonar	39
6.2. Pneumocistose extrapulmonar	41

7. Diagnóstico da pneumocistose	43
7. 1. Diagnóstico presuntivo	43
7. 2. Diagnóstico definitivo	45
7.2.1. Amostras clínicas	45
7.2.2. Métodos citoquímicos de coloração	47
7.2.3. Métodos imunofluorescentes de coloração	47
7.2.4. Métodos moleculares	48
8. Tratamento e profilaxia da pneumocistose	51
8. 1. Tratamento etiológico	52
8. 2. Tratamento adjuvante com corticosteroides	55
8. 3. Profilaxia	55
9. Estudo do desenvolvimento da resistência de <i>P. jirovecii</i> ao cotrimoxazol.....	59
9. 1. Polimorfismos no gene da DHPS de <i>P. jirovecii</i>	61
9.1.1. Associação da presença das mutações no gene da DHPS e a exposição às sulfas	64
9.1.2. Importância clínica das mutações no gene da DHPS de <i>P. jirovecii</i>	67
9. 2. Polimorfismos no gene da DHFR de <i>P. jirovecii</i>	68
 Segunda parte – Estudo da resistência de <i>P. jirovecii</i> ao cotrimoxazol em doentes com	
infecção VIH/SIDA	73
Capítulo I. Objectivos	75
Capítulo II. Material e métodos	79
1. População estudada	81
1.1. Estudo da estabilidade dos genótipos	81
1.2. Estudo retrospectivo	81
2. Processamento das amostras	82
2.1. Tratamento das lâminas de microscopia com poli-L-lisina	82
2.2. Expectoração induzida (EI) e secreção brônquica (SB)	82
2.3. Lavado broncoalveolar (LBA)	83
2.4. Lavado oral (LO)	83
3. Identificação parasitológica	84

3.1. Imunofluorescência indirecta com anticorpos monoclonais	84
4. Filtração e extracção de DNA genómico total	85
4.1. Microfiltração das amostras de secreções pulmonares	85
4.2. Extracção de DNA, pelo método de Mini–BeadBeeter/tiocianato de guanidina–sílica.....	86
4.2. Quantificação de DNA genómico total	87
5. Identificação molecular	88
5.1. Amplificação de um fragmento do rRNA mitocondrial de <i>P. jirovecii</i>	88
5.2. Amplificação de um fragmento do gene da β -globina humana	90
5.3. Visualização do DNA amplificado	92
6. Caracterização genética de isolados de <i>P. jirovecii</i>	93
6.1. Caracterização genética do gene da DHPS, por análise de PCR –RFLP	94
6.1.1. Amplificação do gene da DHPS, por PCR touchdown	95
6.1.2. Amplificação do gene da DHPS, por PCR “nested”	96
6.1.3. Visualização do DNA amplificado	97
6.1.4. Hidrólise do DNA amplificado, por endonucleases de restrição–RFLP	97
6.2. Caracterização genética do gene da DHFR, por sequenciação de DNA	98
6.2.1. Amplificação do gene da DHFR, por PCR “nested”	99
6.2.2. Visualização do DNA amplificado	100
6.3. Caracterização genética das regiões ITS do rRNA nuclear, por sequenciação de DNA....	101
6.3.1. Amplificação das regiões ITS do rRNA nuclear, por PCR “nested”	101
6.3.2. Visualização do DNA amplificado	103
6.4. Purificação e sequenciação directa dos fragmentos amplificados por PCR	103
6.5. Clonagem de fragmentos amplificados por PCR e sequenciação do DNA clonado	105
6.6. Análise bioinformática	107
7. Análise estatística	107
Capítulo III. Identificação de <i>P. jirovecii</i> em doentes imunocomprometidos	109
1. Introdução	111
2. Resultados	112
3. Discussão	117

Capítulo IV. Detecção do gene da DHPS de <i>P. jirovecii</i>	119
1. Introdução	121
2. Resultados	122
2.1. Quantificação do DNA exógeno	125
3. Discussão	127
Capítulo V. Estudo da variação genética da DHPS de <i>P. jirovecii</i>	131
1. Introdução	133
2. Resultados	134
3. Discussão	145
Capítulo VI Estudo da variação genética da DHFR de <i>P. jirovecii</i>	151
1. Introdução	153
2. Resultados	154
3. Discussão	163
Capítulo VII. Estudo da variação genética das regiões ITS do rRNA de <i>P. jirovecii</i>	167
1. Introdução	169
2. Resultados	170
3. Discussão	182
Capítulo VIII. Análise genética multilocus de <i>P. jirovecii</i>	187
1. Introdução	189
2. Resultados	189
3. Discussão	201
Capítulo IX. Conclusões	205
Capítulo X. Referências bibliográficas	211

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Representação esquemática de um trofozoíto de <i>Pneumocystis</i>	6
FIGURA 2. Representação esquemática de um quisto de <i>Pneumocystis</i>	7
FIGURA 3. Representação esquemática do ciclo de vida proposto para <i>Pneumocystis</i>	11
FIGURA 4. Representação esquemática da organização genómica dos genes que codificam o rRNA nuclear e das regiões ITS	34
FIGURA 5. Representação esquemática da inibição da via biossintética do ácido fólico, pelas sulfamidas e trimetoprim	53
FIGURA 6. Quistos de <i>P. jirovecii</i> , visualizados pela técnica de IFI com AcM, em secreções pulmonares	113
FIGURA 7. Electroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação por PCR “nested” de um fragmento de 263 pb do gene que codifica a subunidade grande do rRNA mitocondrial	114
FIGURA 8. Representação gráfica do número de isolados de <i>P. jirovecii</i> , identificados por técnicas parasitológicas e moleculares, entre Março de 2001 e Outubro de 2004, em função dos meses do ano	116
FIGURA 9. Electroforese em gel de agarose de produtos de amplificação e hidrólise pelas endonucleases de restrição <i>AccI</i> e <i>HaeIII</i> de um fragmento do gene da DHPS de <i>P. jirovecii</i>	136
FIGURA 10. Representação gráfica da distribuição dos génotipos da DHPS de <i>P. jirovecii</i> , ao longo do período de tempo estudado	139
FIGURA 11. Electroforese em gel de agarose do produto de amplificação de um fragmento do gene da DHFR de <i>P. jirovecii</i>	155
FIGURA 12. Alinhamento das sequências de aminoácidos da dihidrofolato redutase de <i>P. jirovecii</i> e de outros microrganismos	164
FIGURA 13. Electroforese em gel de agarose do produto de amplificação de um fragmento das regiões ITS do gene de rRNA de <i>P. jirovecii</i>	171

FIGURA 14. Representação gráfica da distribuição das sequências polimórficas dos genes da DHPS e da DHFR entre os genótipos ITS, em 100 isolados de <i>P. jirovecii</i> , recolhidos entre 1995 e 2004	193
---	-----

ÍNDICE DE QUADROS

QUADRO I. Exemplos da nomenclatura trinominal para <i>Pneumocystis carinii</i>	17
QUADRO II. Genes utilizados na tipagem de <i>P. jirovecii</i>	33
QUADRO III. Sequência de nucleótidos dos genótipos da região ITS 1, do rRNA nuclear, de <i>P. jirovecii</i> , segundo a nomenclatura de Lee <i>et al.</i> (1998) e actualizada em Matos <i>et al.</i> (2003a)	36
QUADRO IV. Sequência de nucleótidos dos genótipos da região ITS 2, do rRNA nuclear, de <i>P. jirovecii</i> , segundo a nomenclatura de Lee <i>et al.</i> (1998) e actualizada em Matos <i>et al.</i> (2003)	37
QUADRO V. Genótipos observados nos gene da DHPS de <i>P. jirovecii</i>	62
QUADRO VI. Prevalência de mutações no gene da DHPS de <i>P. jirovecii</i> , em doentes imunocomprometidos com PPc, e a associação com a exposição aos fármacos da família das sulfas	65
QUADRO VII. Polimorfismos identificados no gene da DHFR de <i>P. jirovecii</i>	70
QUADRO VIII. Quantificação da carga parasitária das amostras positivas, por IFI-AcM, para <i>P. jirovecii</i>	85
QUADRO IX. Oligonucleótidos iniciadores utilizados na amplificação por PCR do gene que codifica a subunidade grande do rRNA mitocondrial de <i>P. jirovecii</i>	89
QUADRO X. Condições térmicas de amplificação por PCR do gene que codifica a subunidade grande do rRNA mitocondrial de <i>P. jirovecii</i>	90
QUADRO XI. Oligonucleótidos iniciadores utilizados na amplificação por PCR do gene que codifica a β -globina humana	91
QUADRO XII. Condições térmicas de amplificação por PCR do gene que codifica a β -globina humana	92
QUADRO XIII. Oligonucleótidos iniciadores utilizados na amplificação por PCR do gene da DHPS de <i>P. jirovecii</i>	95
QUADRO XIV. Condições térmicas de amplificação por PCR do gene da DHPS de <i>P. jirovecii</i> ...	96

QUADRO XV. Oligonucleótidos iniciadores utilizados na amplificação por PCR do gene da DHFR de <i>P. jirovecii</i>	100
QUADRO XVI. Condições térmicas de amplificação por PCR do gene da DHFR de <i>P. jirovecii</i> ..	100
QUADRO XVII. Oligonucleótidos iniciadores utilizados na amplificação por PCR das regiões ITS do rRNA nuclear <i>P. jirovecii</i>	102
QUADRO XVIII. Condições térmicas de amplificação por PCR das regiões ITS do rRNA nuclear de <i>P. jirovecii</i>	103
QUADRO XIX. Carga parasitária de <i>P. jirovecii</i> , detectada nas 119 amostras positivas por IFI com AcM	113
QUADRO XX. Identificação de <i>P. jirovecii</i> , por técnicas parasitológicas e moleculares, em 403 amostras de secreções pulmonares	115
QUADRO XXI. Amplificação por PCR do gene da DHPS de <i>P. jirovecii</i> em 40 doentes seropositivos para VIH	123
QUADRO XXII. Efeito da adição de DNA humano na eficiência da amplificação do gene da DHPS de <i>P. jirovecii</i> , em cinco amostras pulmonares	125
QUADRO XXIII. Quantificação do DNA genómico total em 24 amostras pulmonares não filtradas	126
QUADRO XXIV. Amplificação do gene da DHPS de <i>P. jirovecii</i> em 260 isolados, recolhidos entre Março de 2001 e Outubro de 2004 e identificados por técnicas parasitológicas e moleculares	135
QUADRO XXV. Caracterização genética do gene da DHPS em 219 isolados de <i>P. jirovecii</i> , recolhidos entre 1995 e 2004	137
QUADRO XXVI. Características clínicas e epidemiológicas de seis doentes com mais o que um episódio de pneumocistose documentado	140
QUADRO XXVII. Genótipos da DHPS de <i>P. jirovecii</i> em 29 doentes com amostras repetidas ao longo do episódio de PPc	142
QUADRO XXVIII. Associação entre as principais características epidemiológicas e clínicas e os genótipos da DHPS de <i>P. jirovecii</i> isolados a partir de 177 doentes imunocomprometidos com pneumocistose	144

QUADRO XXIX. Amplificação do gene da DHFR de <i>P. jirovecii</i> em 260 isolados, recolhidos entre Março de 2001 e Outubro de 2004 e identificados por técnicas parasitológicas e moleculares	155
QUADRO XXX. Caracterização genética do gene da DHFR em 119 isolados de <i>P. jirovecii</i> , recolhidos entre 1995 e 2004	157
QUADRO XXXI. Caracterização genética da DHFR de <i>P. jirovecii</i> isolado a partir de sete doentes com amostras repetidas ao longo do episódio de PPc	159
QUADRO XXXII. Associação entre as principais características epidemiológicas e clínicas e os genótipos da DHFR de <i>P. jirovecii</i> isolado de 108 doentes imunocomprometidos com PPc	162
QUADRO XXXIII. Amplificação de um fragmento de 550 pb das regiões ITS do gene que codifica o rRNA nuclear de <i>P. jirovecii</i> em 260 isolados, recolhidos entre Março de 2001 e Outubro de 2004 e identificados por técnicas parasitológicas e moleculares	172
QUADRO XXXIV. Caracterização genética das regiões ITS do gene que codifica o rRNA nuclear em 166 isolados de <i>P. jirovecii</i> , recolhidos entre 1995 e 2004	173
QUADRO XXXV. Caracterização genética das regiões ITS do gene que codifica o rRNA nuclear, nos fragmentos clonados de 11 isolados de <i>P. jirovecii</i>	174
QUADRO XXXVI. Caracterização genética das regiões ITS de <i>P. jirovecii</i> isolado nas secreções pulmonares seriadas em 14 episódios de PPc de 14 doentes seropositivos para VIH	175
QUADRO XXXVII. Associação entre as principais características epidemiológicas e clínicas e os genótipos ITS de <i>P. jirovecii</i> isolado de 148 doentes imunocomprometidos com PPc	179
QUADRO XXXVIII. Caracterização genética de três <i>loci</i> em 100 isolados de <i>P. jirovecii</i> , recolhidos entre 1995 e 2004	191
QUADRO XXXIX. Associação entre as sequências de DNA identificadas nos genes que codificam as enzimas DHPS e DHFR de <i>P. jirovecii</i> , em 100 isolados recolhidos entre 1995 e 2004	193
QUADRO XL. Associação entre os genótipos identificados nos genes que codificam as enzimas DHPS e DHFR e os genótipos ITS detectados em 100 isolados de <i>P. jirovecii</i> , recolhidos entre 1995 e 2004	194

QUADRO XLI. Combinações alélicas dos genes da DHPS da DHFR e das regiões ITS do gene de rRNA em 100 isolados de <i>P. jirovecii</i>	196
QUADRO XLII. Caracterização genética multilocus em seis doentes imunocomprometidos com PPc, com amostras de secreções pulmonares seriadas	197
QUADRO XLIII. Associação entre as principais características epidemiológicas e clínicas e os genótipos multilocus de <i>P. jirovecii</i> isolado de 92 doentes imunocomprometidos com PPc	199