

**SÓNIA SOFIA DANTAS CALÉ**

**ESTUDO DE NOVOS MARCADORES  
SEROLÓGICOS PARA O DIAGNÓSTICO DA  
PNEUMONIA POR *PNEUMOCYSTIS JIROVECII***

**Orientador: Doutor Francisco Vaz de Carvalho Esteves**

**Co-orientadora: Professora Doutora Olga Maria Guerreiro de Matos**

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias**

**Faculdade de Engenharia e Ciências Naturais**

**Lisboa**

**2012**

**SÓNIA SOFIA DANTAS CALÉ**

**ESTUDO DE NOVOS MARCADORES  
SEROLÓGICOS PARA O DIAGNÓSTICO DA  
PNEUMONIA POR *PNEUMOCYSTIS JIROVECI***

Dissertação apresentada para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biotecnológica no curso de Mestrado em Engenharia Biotecnológica conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

Orientador: Doutor Francisco Vaz de Carvalho Esteves

Co-Orientador: Professora Doutora Olga Maria Guerreiro de Matos

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias**

**Faculdade de Engenharia e Ciências Naturais**

**Lisboa**

**2012**

*Life shrinks or expands in proportion to one's courage.*

Anais Nin (1939-1944), “The Diary of Anais Nin vol. 3”

*À minha família, em especial*

*À minha “Nonô”*

# Agradecimentos

Gostaria de expressar a minha gratidão, a todos aqueles que de algum modo tornaram possível a realização deste trabalho.

À Doutora Alexandra Fernandes, Directora do mestrado de Engenharia Biotecnológica da ULHT, por tudo o que me ensinou e pela prontidão sempre que necessária.

Aos meus orientadores e professores Doutor Francisco Esteves e Professora Doutora Olga Matos, por toda a disponibilidade, orientação, dedicação, compreensão e pelo que me ensinaram. Um muito Obrigado por terem contribuído para a minha aprendizagem e para o meu crescimento, tanto intelectual como pessoal.

A todos os colegas do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, nomeadamente, do Grupo de Protozoários Oportunistas/VIH e Outras Protozooses, em especial à Doutora Luísa Lobo e Doutora Vera Códices, que me acolheram desde o primeiro dia, sempre prontificadas a ajudar.

Aos meus colegas e amigos, em especial, Ana Pedralva, Andreia Ferreira, Camila Fernandes, André Tavares, Flávio Flór, Mário Bordalo, Guilherme Pombeiro e por todos aqueles que me apoiaram incondicionalmente.

Aos meus pais e irmãos que, cada um de sua maneira, sempre me deram força para ultrapassar os obstáculos da vida. Obrigada pelas sábias palavras, educação, paciência e sacrifícios.

Ao resto da minha família que, mesmo longe, sempre esteve presente.

A todos, muito obrigada.

## Publicações e apresentações

A partir dos resultados obtidos no decorrer do presente trabalho, foram apresentados os seguintes estudos, cujos resumos foram publicados em livros de resumos:

**Calé, S. S.**, Matos, O., De Sousa, B., Gaspar, J., Badura, R., Antunes, F. & Esteves, F. (2012). S-adenosyl Methionine and KL-6 as serological markers for diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* [resumo PA3]. (Apresentação em painel) XIII International Workshops on Opportunistic Protists (IWOP), Tarrytown, New York, USA. Livro de resumos: 80.

Esteves, F., **Calé, S. S.**, Seringa, M., Badura, R., De Sousa, B., Fernandes, C., Gaspar, J., Lee, C-H., Antunes, F. & Matos, O. (2012). Biomarcadores serológicos no contexto da pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* (PPc): uma abordagem moderna para uma enfermidade centenária [resumo CO-13]. (Apresentação oral) XVI Congresso Português de Parasitologia, Lisboa, Portugal. *Acta Parasitológica Portuguesa* 19 (1/2): 114-115.

## Índice geral

|                                                                                  |           |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| ÍNDICE DE FIGURAS .....                                                          | vii       |
| ÍNDICE DE QUADROS .....                                                          | viii      |
| LISTA DE ABREVIATURAS .....                                                      | x         |
| RESUMO .....                                                                     | xv        |
| ABSTRACT .....                                                                   | xvi       |
| RÉSUMÉ .....                                                                     | xvii      |
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                                                        | <b>1</b>  |
| 1.1. PERSPECTIVA HISTÓRICA .....                                                 | 3         |
| <b>2. TAXONOMIA.....</b>                                                         | <b>4</b>  |
| 2.1. DIVERSIDADE GENÉTICA.....                                                   | 6         |
| <b>3. EPIDEMIOLOGIA .....</b>                                                    | <b>9</b>  |
| <b>4. CICLO DE VIDA.....</b>                                                     | <b>11</b> |
| <b>5. INFECÇÃO E TRANSMISSÃO .....</b>                                           | <b>15</b> |
| <b>6. FISIOPATOLOGIA .....</b>                                                   | <b>17</b> |
| <b>7. TRATAMENTO E PROFILAXIA .....</b>                                          | <b>19</b> |
| <b>8. DIAGNÓSTICO.....</b>                                                       | <b>21</b> |
| 8.1. APRESENTAÇÃO CLÍNICA .....                                                  | 21        |
| 8.2. DIAGNÓSTICO DEFINITIVO .....                                                | 22        |
| 8.3. DIAGNÓSTICO MOLECULAR.....                                                  | 23        |
| 8.4. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO COMPLEMENTARES .....                                 | 24        |
| <b>9. QUANTIFICAÇÃO DE S-ADENOSILMETIONINA E KL-6 PELO ENSAIO DE ELISA .....</b> | <b>25</b> |
| 9.1. KREBS VON DEN LUNGEN (KL)-6 .....                                           | 25        |
| 9.2. S-ADENOSILMETIONINA (SAM) .....                                             | 26        |
| 9.3. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO - ELISA.....                                         | 27        |
| <b>10. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                                              | <b>31</b> |
| 10.1. OBJECTO DE ESTUDO .....                                                    | 31        |
| 10.2. CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO EM ESTUDO .....                                | 31        |
| 10.3. INFORMAÇÃO CLÍNICA .....                                                   | 31        |
| 10.4. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS .....                                           | 32        |
| 10.4.1.AMOSTRAS DE SANGUE .....                                                  | 32        |
| 10.4.2.SECREÇÕES PULMONARES .....                                                | 32        |
| 10.4.3.EXPECTORAÇÃO INDUZIDA (EI).....                                           | 33        |

|                                                                                                        |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 10.4.4.LAVADO BRONCOALVEOLAR (LBA).....                                                                | 33        |
| 10.5. DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO.....                                                                  | 34        |
| 10.6. DIAGNÓSTICO MOLECULAR .....                                                                      | 37        |
| 10.6.1.EXTRACÇÃO DE DNA GENÓMICO PELO MÉTODO DE MINI<br>BEADBEETER/TIOCIANATO DE GUANIDINA-SÍLICA..... | 37        |
| 10.6.2.AMPLIFICAÇÃO DO MTLSU rRNA PELA PCR NESTED.....                                                 | 39        |
| 10.7. QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS SEROLÓGICOS DE KL-6 .....                                               | 41        |
| 10.8. QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS SEROLÓGICOS DE SAM .....                                                | 42        |
| 10.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....                                                                        | 42        |
| <b>11. RESULTADOS .....</b>                                                                            | <b>43</b> |
| 11.1. KL-6 .....                                                                                       | 43        |
| 11.1.1.CASOS CLÍNICOS EM ESTUDO .....                                                                  | 43        |
| 11.1.2.ANÁLISE DOS NÍVEIS SEROLÓGICOS DE KL-6 .....                                                    | 47        |
| 11.2. SAM .....                                                                                        | 57        |
| 11.2.1.CASOS CLÍNICOS EM ESTUDO .....                                                                  | 57        |
| 11.2.2.ANÁLISE DOS NÍVEIS SEROLÓGICOS DE SAM .....                                                     | 61        |
| <b>12. DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>                                                      | <b>70</b> |
| 12.1. DISCUSSÃO .....                                                                                  | 70        |
| 12.1.1.ANÁLISE DE KL-6 .....                                                                           | 70        |
| 12.1.2.ANÁLISE DE SAM .....                                                                            | 76        |
| 12.2. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....                                                                       | 78        |
| <b>13. PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>                                                                   | <b>81</b> |
| <b>14. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                                                            | <b>82</b> |

## Índice de figuras

|                                                                                                                                                                                 | Pág. |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <b>Figura 1.</b> Dendrograma representando a divergência entre as diferentes sequências nucleotídicas de isolados de <i>Pneumocystis</i> de diferentes espécies de hospedeiros. | 8    |
| <b>Figura 2.</b> Quisto de <i>Pneumocystis</i> (C) imaturo contendo seis corpos intraquísticos; trofozóito (T).                                                                 | 12   |
| <b>Figura 3.</b> Hipótese do ciclo de vida para <i>Pneumocystis</i> .                                                                                                           | 13   |
| <b>Figura 4.</b> Esquema dos formatos ELISA mais comuns.                                                                                                                        | 28   |
| <b>Figura 5.</b> Esquema do princípio da reacção do método ELISA “sandwich”.                                                                                                    | 29   |
| <b>Figura 6.</b> Esquema de um ensaio ELISA competitivo.                                                                                                                        | 30   |
| <b>Figura 7.</b> Quístos de <i>P. jirovecii</i> corados por IFI/AcM, numa amostra de LBA.                                                                                       | 35   |
| <b>Figura 8.</b> Distribuição dos casos clínicos em função das condições associadas ao estado de imunossupressão.                                                               | 46   |
| <b>Figura 9.</b> Representação gráfica da distribuição dos níveis de KL-6 nos casos de PPc e nos doentes sem PPc.                                                               | 48   |
| <b>Figura 10.</b> Representação gráfica da distribuição dos níveis de KL-6 nos diferentes grupos clínicos.                                                                      | 49   |
| <b>Figura 11.</b> Representação gráfica da distribuição dos níveis de KL-6 dos casos PPc (grupo A/B:), assintomáticos (grupo C) e casos PPc negativos (grupo D).                | 50   |
| <b>Figura 12.</b> Representação gráfica da curva de ROC para o KL-6.                                                                                                            | 51   |
| <b>Figura 13.</b> Distribuição dos casos clínicos em função das condições associadas ao estado de imunossupressão.                                                              | 60   |
| <b>Figura 14.</b> Representação gráfica da distribuição dos níveis de SAM nos casos com PPc e nos doentes sem PPc.                                                              | 62   |
| <b>Figura 15.</b> Representação gráfica da distribuição dos níveis de SAM nos diferentes grupos clínicos.                                                                       | 63   |
| <b>Figura 16.</b> Representação gráfica da distribuição dos níveis de SAM dos casos PPc (grupo A/B), assintomáticos (grupo C) e casos PPc negativos (grupo D).                  | 64   |
| <b>Figura 17.</b> Representação gráfica da curva de ROC para o KL-6 e SAM.                                                                                                      | 69   |

## Índice de quadros

|                      | <b>Pág.</b>                                                                                                                                       |
|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Quadro I.</b>     | Critérios utilizados para a determinação da carga parasitária dos isolados de P.j.. 36                                                            |
| <b>Quadro II.</b>    | Características dos <i>primers</i> utilizados para o diagnóstico molecular por amplificação do gene mtLSU rRNA pela PCR <i>nested</i> . 39        |
| <b>Quadro III.</b>   | Condições utilizadas, em ambas as etapas da PCR <i>nested</i> , para amplificação do gene <i>mtLSU rRNA</i> de <i>Pneumocystis jirovecii</i> . 40 |
| <b>Quadro VI.</b>    | Características clínicas dos doentes em estudo para o KL-6. 44                                                                                    |
| <b>Quadro V.</b>     | Resultados do diagnóstico laboratorial. 45                                                                                                        |
| <b>Quadro VI.</b>    | Distribuição dos casos clínicos, consoante o grupo etário. 46                                                                                     |
| <b>Quadro VII.</b>   | Medianas dos níveis de KL-6 (U/mL). 47                                                                                                            |
| <b>Quadro VIII.</b>  | Medianas dos níveis de KL-6 (U/mL) nos diferentes grupos de amostras estudadas. 47                                                                |
| <b>Quadro IX.</b>    | Níveis serológicos de KL-6 (U/mL), como diagnóstico de PPc. Análise de diferentes valores de <i>cut-off</i> . 52                                  |
| <b>Quadro X.</b>     | Medianas dos níveis de KL-6 (U/mL) nos diferentes grupos de amostras estudadas, em função das condições associadas à imunossupressão. 53          |
| <b>Quadro XI.</b>    | Medianas dos níveis de KL-6 (U/mL) nos diferentes grupos de amostras, em função da carga parasitária. 54                                          |
| <b>Quadro XII.</b>   | Medianas dos níveis de KL-6 (U/mL) em função das diferentes características clínicas. 56                                                          |
| <b>Quadro XIII.</b>  | Características clínicas dos doentes em estudo para a SAM. 58                                                                                     |
| <b>Quadro XIV.</b>   | Resultados do diagnóstico laboratorial. 59                                                                                                        |
| <b>Quadro XV.</b>    | Distribuição dos casos clínicos, consoante o grupo etário. 60                                                                                     |
| <b>Quadro XVI.</b>   | Medianas dos níveis de SAM (nM). 61                                                                                                               |
| <b>Quadro XVII.</b>  | Medianas dos níveis de SAM (nM) nos diferentes grupos de amostras estudadas. 61                                                                   |
| <b>Quadro XVIII.</b> | Níveis serológicos de SAM (nM) para o diagnóstico de PPc. Análise de diferentes valores de <i>cut-off</i> . 65                                    |

- Quadro XIX.** Medianas dos níveis de SAM (nM) nos diferentes grupos de 66 amostras estudadas, em função das condições associadas à imunossupressão.
- Quadro XX.** Medianas dos níveis de SAM (nM) nos diferentes grupos de 66 amostras, em função da carga parasitária.
- Quadro XXI.** Medianas dos níveis de SAM (nM) em função das diferentes 68 características clínicas.

## Lista de abreviaturas

|          |                                                                                                                                         |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| %        | Percentagem                                                                                                                             |
| °C       | Graus Celsius                                                                                                                           |
| 16S rRNA | Subunidade pequena do RNA ribossómico                                                                                                   |
| AcM      | Anticorpo monoclonal                                                                                                                    |
| ATP      | Adenosina trifosfato                                                                                                                    |
| AUC      | Área abaixo da curva ROC (do inglês, <i>area under the curve</i> )                                                                      |
| BSA      | Albumina sérica bovina (do inglês, <i>bovine serum albumin</i> )                                                                        |
| CDC      | Centro de controlo e prevenção de doenças dos Estados Unidos da América (do inglês, <i>Centers for Disease Control and Prevention</i> ) |
| DHFR     | Dihidrofolato reductase                                                                                                                 |
| DHFS     | Dihidrofolato sintetase                                                                                                                 |
| DHPS     | Dihidropteroato sintetase                                                                                                               |
| DMSO     | Dimetilsulfóxido                                                                                                                        |
| DNA      | Ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i> )                                                                    |
| dNTP     | Desoxirribonucleótido trifosfato                                                                                                        |
| ECDC     | Centro Europeu de controlo e prevenção de doenças (do inglês, <i>European Centers for Disease Control and Prevention</i> )              |
| EDTA     | Ácido etilenodiaminotetracético                                                                                                         |
| EF3      | Factor de elongação 3 (do inglês, <i>elongation factor 3</i> )                                                                          |
| EI       | Expectoração induzida                                                                                                                   |
| ELISA    | Teste imunoenzimático específico (do inglês, <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )                                                 |

|               |                                                                                                          |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| E.U.A.        | Estados Unidos da América                                                                                |
| FAS           | Proteína trifuncional responsável pela síntese de ácido fólico (do inglês, <i>folic acid synthesis</i> ) |
| Fc- $\gamma$  | Receptor Fc <i>gamma</i>                                                                                 |
| FPI           | Fibrose pulmonar idiopática                                                                              |
| f. sp.        | <i>Formae specialis</i>                                                                                  |
| G             | Grama                                                                                                    |
| G             | Aceleração gravitacional (unidade de força centrífuga relativa)                                          |
| GMS           | Coloração pela metenamina prata (do inglês, <i>Gomori methenamine silver stain</i> )                     |
| HCl           | Ácido clorídrico                                                                                         |
| HPLC          | Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, <i>High-performance liquid chromatography</i> )     |
| HRB           | Peroxidase de rábano                                                                                     |
| IF            | Imunofluorescência                                                                                       |
| IFI           | Imunofluorescência indirecta                                                                             |
| IgG           | Imunoglobulina do tipo G                                                                                 |
| IgM           | Imunoglobulina do tipo M                                                                                 |
| IL-1 $\beta$  | Interleucina 1 <i>beta</i>                                                                               |
| IL-6          | Interleucina 6                                                                                           |
| IL-8          | Interleucina 8                                                                                           |
| IFN- $\gamma$ | Interferão <i>gamma</i>                                                                                  |

|                   |                                                                                             |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| Kb                | Quilobases                                                                                  |
| kDa               | Quilodaltons                                                                                |
| KEX1              | Protease sérica (do inglês, <i>kexin-like serine protease</i> )                             |
| KL-6              | <i>Krebs von den Lungen</i>                                                                 |
| L                 | Litro                                                                                       |
| $\lambda$         | <i>Lambda</i> , correspondente ao comprimento de onda                                       |
| LBA               | Lavado broncoalveolar                                                                       |
| LDH               | Desidrogenase láctica (do inglês, <i>lactate dehydrogenase</i> )                            |
| LO                | Lavado oral                                                                                 |
| M                 | Molar                                                                                       |
| MAT               | Metionina adenosiltransferase                                                               |
| MIP-2             | Proteína inflamatória de macrófago 2 (do inglês, <i>macrophage inflammatory protein 2</i> ) |
| mg                | Miligrama                                                                                   |
| MgCl <sub>2</sub> | Cloreto de magnésio                                                                         |
| mL                | Mililitro                                                                                   |
| mM                | Milimolar                                                                                   |
| mm <sup>3</sup>   | Milímetro cúbico                                                                            |
| mmHg              | Milímetros de mercúrio                                                                      |
| nM                | Nanomolar                                                                                   |
| MSG               | Glicoproteínas major de superfície (do inglês, <i>major surface glycoproteins</i> )         |

|                  |                                                                                                                         |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| mtLSU rRNA       | Subunidade grande do RNA ribossómico mitocondrial (do inglês, <i>mitochondrial large subunit ribosomal RNA</i> )        |
| mtSSU rRNA       | Subunidade pequena do RNA ribossómico mitocondrial (do inglês, <i>mitochondrial small subunit ribosomal</i> )           |
| MUC-1            | Glicoproteína transmembranar de elevado peso molecular, expressa na maioria das células epiteliais glandulares.         |
| N                | Número                                                                                                                  |
| NAD              | Nicotinamida adenina dinucleótido (do inglês, <i>nicotinamide adenine dinucleotide</i> )                                |
| NADPH            | Nicotinamida adenina dinucleótido hidrofosfatado (do inglês, <i>nicotinamide adenine dinucleotide hydro phosphate</i> ) |
| ng               | Nanograma                                                                                                               |
| Nm               | Nanómetro                                                                                                               |
| O <sub>2</sub>   | Oxigénio molecular                                                                                                      |
| P                | Probabilidade                                                                                                           |
| PABA             | Ácido para-aminobenzóico (do inglês, <i>para-aminobenzoic acid</i> )                                                    |
| PaO <sub>2</sub> | Pressão parcial do oxigénio                                                                                             |
| Pb               | Pares de base                                                                                                           |
| PBS              | Tampão fosfato salino (do inglês, <i>phosphate buffered saline</i> )                                                    |
| PCR              | Reacção de polimerização em cadeia (do inglês, <i>polymerase chain reaction</i> )                                       |
| P.j.             | <i>Pneumocystis jirovecii</i>                                                                                           |
| PPc              | Pneumonia por <i>Pneumocystis jirovecii</i>                                                                             |
| ROC              | Curva ROC (do inglês, <i>Receiver Operating Characteristic</i> )                                                        |
| RNA              | Ácido ribonucleico (do inglês, <i>ribonucleic acid</i> )                                                                |

|                    |                                                                                                                 |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| rRNA               | Ácido ribonucleico ribossómico (do inglês, <i>ribosomal ribonucleic acid</i> )                                  |
| SAM                | S-adenosilmetionina                                                                                             |
| Sida               | Síndrome de imunodeficiência adquirida                                                                          |
| SMX                | Sulfametoxazol                                                                                                  |
| TAE                | Tampão tris-acetato-EDTA                                                                                        |
| TARV               | Terapêutica antiretroviral                                                                                      |
| T CD4 <sup>+</sup> | Linfócitos T com receptores do agrupamento de diferenciação 4 (do inglês, <i>cluster of differentiation 4</i> ) |
| TNF- $\alpha$      | Factor de necrose tumoral <i>alfa</i>                                                                           |
| Tris-HCl           | Tris (hidroximetilo) aminometano-ácido clorídrico                                                               |
| TS                 | Timidilato sintetase                                                                                            |
| TMP                | Trimetoprim                                                                                                     |
| U                  | Unidade                                                                                                         |
| UV                 | Ultravioleta                                                                                                    |
| V                  | Volt                                                                                                            |
| VIH                | Vírus da imunodeficiência humana                                                                                |
| $\chi^2$           | Teste do Chi-quadrado                                                                                           |
| $\mu\text{L}$      | Microlitro                                                                                                      |
| $\mu\text{m}$      | Micrómetro                                                                                                      |

## Resumo

*Pneumocystis jirovecii* (P.j.) é um organismo oportunista responsável por uma das infecções mais severas em doentes imunocomprometidos, a pneumonia por *Pneumocystis* ou pneumocistose (PPc). O diagnóstico laboratorial é baseado em colorações histoquímicas, imunofluorescência indirecta com anticorpos monoclonais e técnica de PCR em secreções pulmonares. Estudos sugerem que *Krebs von den Lungen-6* (KL-6), e S-adenosilmetionina (SAM), poderão ser utilizados como indicadores sensíveis para o diagnóstico da PPc. O objectivo do presente trabalho é a avaliação destes dois marcadores no diagnóstico serológico da PPc, utilizando dois ensaios ELISA. Soro e espécimes pulmonares foram obtidos de 145 doentes (1997-2012). O soro de 37 dadores foi utilizado como controlo negativo.

Dos 145 doentes, 92 eram casos confirmados de PPc (mediana: KL-6 969 U/mL; SAM 38 nmol/L) e 53 possuíam outra patologia pulmonar (23 colonizados por P.j. e 30 não infectados por P.j.) (mediana: KL-6 437 U/mL; SAM 60 nmol/L). A mediana determinada para os doentes colonizados foi de 409 U/mL (KL-6) e 55 nmol/L (SAM) e, nos doentes sem infecção com P.j. foi de 440 U/mL (KL-6) e 60 nmol/L (SAM). Nos dadores de sangue, a mediana de KL-6 e SAM foi, respectivamente, de 230 U/mL e 75 nmol/L. Níveis altos de KL-6, no soro, ( $> 590$  U/mL) foram estatisticamente associados aos casos de PPc (76%,  $P < 0,001$ ). Estes resultados sugerem que o KL-6 poderá ser um candidato para o diagnóstico serológico de PPc, principalmente quando utilizado em associação com outros marcadores.

Palavras-chave: ELISA, KL-6, *Pneumocystis jirovecii* pneumonia, SAM.

## Abstract

*Pneumocystis jirovecii* (P.j.) is an opportunistic pathogen responsible for one of the most severe infections in immunocompromised patients, *Pneumocystis* pneumonia (PcP). The laboratory diagnosis of PcP is based on cytochemical staining, indirect immunofluorescence with monoclonal antibodies and PCR on pulmonary secretions. Studies suggest that *Krebs von den Lungen-6* (KL-6) and S-adenosyl Methionine (SAM) may be used as sensitive indicators for PcP diagnosis. The aim of the present work is to evaluate these two potential serological markers, using two different ELISA assays. Sera and pulmonary specimens were obtained from 145 Portuguese patients, for diagnostic purpose (1997-2012). Sera were collected from 37 blood donors (negative control group).

Of the 145 patients, 92 were PcP positive (median: KL-6 969 U/mL; SAM 38 nmol/L) and 53 were PcP negative (23 were colonized by P.j. and 30 were not infected by P.j.) (median: KL-6 437 U/mL; SAM 60 nmol/L). The median serologic markers levels detected for the colonized carriers were 409 U/mL (KL-6) and 55 nmol/L (SAM) while in the patients without P.j. infection were 440 U/mL (KL-6) and 60 nmol/L (SAM). In the blood donors the median KL-6 level was 230 U/mL, while the median SAM serological level was 75 nmol/L. Sera presenting high levels of KL-6 (>590 U/mL) were statistically associated with PcP cases (76%,  $P < 0.001$ ). These results suggest that KL-6 might be a candidate to use in PcP serologic diagnosis, mostly when used in association with other markers.

Key-words: ELISA, KL-6, *Pneumocystis jirovecii* pneumonia, SAM.

## Résumé

*Pneumocystis jirovecii* (P.j.) c'est un organisme opportuniste responsable d'une des infections les plus sévères des patients immunodéprimés, la pneumocystose. Le diagnostic laboratoire est basé sur les colorations histochimiques, immunofluorescence indirecte avec des anticorps monoclonaux et technique de PCR dans les sécrétions pulmonaires. Études suggèrent que *Krebs von den Lungen-6* (KL-6) et S-adénosylméthionine (SAM) pourrait être utilisées comme indicateurs sensibles pour le diagnostic de PPc. L'objectif de ce travail est la validité de ces potentiels marqueurs sérologiques du diagnostic de PPc, utilisant deux entraînements ELISA. Le sérum et les espèces pulmonaires ont été obtenus par 145 malades (1997-2012) et 37 donneurs comme contrôle négative.

Parmi les 145 malades, 92 sont des cas confirmés de PPc (médiane: KL-6 969 U/mL; SAM 38 nmol/L) et 53 avaient d'autre pathologie pulmonaire mais pas la PPc (23 colonisés pour P.j. et 30 non infectés par le P.j.) (médiane: KL-6 437 U/mL; SAM 60 nmol/L). La médiane détermine pour les malades colonisés furent de 409 U/mL (KL-6) et 55 nmol/L (SAM) et, parmi les malades sans infection avec P.j. c'était de 440 U/mL (KL-6) et 60 nmol/L (SAM). Parmi les donneurs de sang, la médiane de KL-6 et SAM était, respectivement de 230 U/mL et 75 nmol/L. Le sérum contient des niveaux de KL-6 élevés ( $> 590$  U/mL) étaient statistiquement associés aux cas de PPc (76%,  $P < 0.001$ ). Ces résultats suggèrent que le KL-6 pourrait être un candidat pour le diagnostic sérologique de PPc, principalement quand l'utilisé en association avec d'autres marqueurs.

Mots-clés: ELISA, KL-6, *Pneumocystis jirovecii*, pneumonie, SAM.

# 1.Introdução

*Pneumocystis jirovecii* (P.j.), anteriormente designado por *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis*, é um organismo patogénico oportunista responsável por uma das infecções mais severas, e potencialmente mortais em imunocomprometidos, designada por pneumocistose ou PPc [Medrano *et al.*, 2005; Redhead *et al.*, 2006]. Até 1980, esta pneumonia era rara e geralmente associada a sintomas de imunodeficiência, como nos casos de doentes transplantados a fazerem tratamento imunossupressivo, e durante a segunda guerra mundial, em crianças órfãs desnutridas e prematuras [Wakefield, 2002; Cushion, 2004]. No entanto, com a pandemia do vírus de imunodeficiência humana (VIH), a PPc emergiu como a principal doença associada ao diagnóstico do Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (sida) [Helweg-Larsen, 2004; Calderón *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2011].

Graças à introdução da terapêutica com antiretrovíricos (TARV) para o tratamento do VIH, houve uma redução substancial da taxa de mortalidade e da incidência de infecções oportunistas, incluindo a PPc. Actualmente, este tipo de pneumonia continua a ter um grande impacto em indivíduos infectados com VIH que não estão sujeitos ou não respondem ao tratamento antiretroviral, ou noutros imunocomprometidos, como doentes sob quimioterapia e/ou transplante de órgãos [Stringer *et al.*, 2002; Morris *et al.*, 2004].

Apesar dos avanços, muitos aspectos sobre a sua epidemiologia permanecem incertos, sendo uma das principais razões, a inexistência de um sistema viável e reprodutível de cultivo *in vitro*. Também é de referir que P.j. é uma espécie de *Pneumocystis* que infecta um único hospedeiro, o Homem. No entanto, é possível, e bastante comum, a utilização de modelos animais, mas como a sua infecção é específica de espécie, com consideráveis diferenças genéticas entre os diversos géneros de *Pneumocystis*, a extrapolação de resultados tem de ser cautelosa e progressiva [Demanche *et al.*, 2001; Helweg-Larsen, 2004; Aliouat-Denis *et al.*, 2008].

O diagnóstico laboratorial é normalmente efectuado através de visualização microscópica de colorações citoquímicas convencionais ou por imunofluorescência dos organismos em secreções pulmonares, sendo útil nos casos com carga parasitária alta ou moderada, mas por vezes, é insuficiente em alguns casos de carga parasitária baixa, ou mesmo, nos casos dos portadores assintomáticos, sendo necessária a utilização de técnicas

moleculares mais sensíveis [Calderón, 2009]. O desenvolvimento da análise molecular, em particular, a possibilidade de amplificação de genes específicos utilizando a técnica de *polymerase chain reaction* (PCR), possibilitou a detecção e genotipagem deste microorganismo, incluindo os casos de carga parasitária reduzida [Thomas & Limper, 2004; Helweg-Larsen, 2004].

De um ponto de vista epidemiológico, é difícil determinar se a presença de *Pneumocystis* se deve apenas a colonização ou infecção. Por outro lado, o diagnóstico definitivo da PPc é efectuado recorrendo-se à observação directa de quistos ou formas tróficas de P.j. em secreções pulmonares obtidas, de um modo geral, através de técnicas invasivas. Até ao momento, ainda não foi definida nenhuma molécula como biomarcador serológico para o diagnóstico definitivo da PPc. Daí a necessidade de novos métodos de diagnóstico para a PPc [Medrano *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2011], sendo o propósito deste trabalho, a aplicação de diferentes métodos para o estudo e caracterização da infecção, procurar novas formas de diagnóstico sensíveis e específicas, com recurso a metodologias menos invasivas e fornecer mais informação sobre a sua epidemiologia, focando essencialmente o estudo dos níveis serológicos de moléculas candidatas a biomarcadores de diagnóstico da doença.

## 1.1. Perspectiva histórica

A história do género *Pneumocystis* começou oficialmente no Brasil em 1909, onde Carlos Chagas descobriu as formas quísticas de *Pneumocystis* em pulmões de porquinhos-da-índia, no decorrer dos seus estudos sobre tripanossomíase humana americana. Considerando que se tratavam de esquizontes tecidulares do ciclo de vida de uma nova espécie de *Trypanosoma*, propôs o género *Schizotrypanum* [Redhead *et al.*, 2006; Aliouat-Denis *et al.*, 2009].

Em 1910, Antonio Carini, encontrou formas microscópicas similares em pulmões de ratos (*Rattus norvegicus*) infectados com *Trypanosoma lewisi*, cujas amostras teciduais enviou para o Instituto Pasteur em Paris, onde Pierre e Marie Delanoë compararam com outros quistos, presentes em ratos da mesma espécie, estes não infectados por *Trypanosoma*. Concluíram, então, que os corpos quísticos reportados por Chagas e Carini pertenciam a uma nova identidade biológica, sugerindo o nome *Pneumocystis carinii*: "*Pneumo*" relacionado com o tropismo para o pulmão, "*cystis*" pela sua forma típica e "*carinii*" em homenagem ao Dr. António Carini [Stringer, 1996; Aliouat-Denis *et al.*, 2009].

No entanto, apenas se tinha referência às formas quísticas de *Pneumocystis*, até 1942, ano em que Van der Meer e Brug publicaram as primeiras fotografias microscópicas das formas tróficas e quísticas de *Pneumocystis* em humanos [Aliouat-Denis *et al.*, 2009].

## 2. Taxonomia

Actualmente, *Pneumocystis* é considerado um género de fungos unicelulares atípicos, presentes nas vias respiratórias de diversas espécies de mamíferos, incluindo humanos. Inicialmente foi classificado como protozoário com base na sua morfologia, na sensibilidade aos fármacos utilizados no tratamento de infecções por protozoários e resistência à acção da grande generalidade de antifúngicos, tal como a anfotericina B que interfere na biossíntese de ergosterol [Stringer *et al.*, 2002].

A natureza fúngica de *Pneumocystis* foi sugerida, em 1970, por Vavra e Kucera, tendo como base estudos ultraestruturais. No entanto, a controvérsia entre a natureza fúngica versus protozoária permaneceu até 1988, altura em que se sequenciou o gene que codifica para a pequena subunidade do ácido ribonucleico ribossomal (16S rRNA), que demonstrou estar mais próxima de fungos que de protozoários [Stringer, 1996; Aliouat-Denis *et al.*, 2009]. Mas, apenas em 1992, com a publicação de vários estudos moleculares estabeleceu-se, definitivamente, uma ligação filogenética com o reino dos fungos, entre eles, a presença na parede celular de  $\beta$ -1,3 D-glucano; de timidilato sintetase (TS) e dihidrofolato reductase (DHFR) como proteínas distintas, como acontece com o fungo *Saccharomyces cerevisiae*, e contrariamente ao que se verifica nos protozoários, nos quais constituem uma única proteína. Outros genes que foram intervenientes no estudo da taxonomia de *Pneumocystis* incluem os codificadores para a  $\alpha$  e  $\beta$ -tubulina, TATA-binding protein e, o mais relevante, o gene que codifica para o factor de alongamento 3 (EF3), até agora só encontrado em fungos [Stringer, 1996; Redhead *et al.*, 2006].

Após a descoberta de que estes organismos são específicos para o hospedeiro, em 1994, adaptou-se, temporariamente, a nomenclatura *P. carinii* f.sp. *hominis* para infecções por *Pneumocystis* em humanos. Finalmente, com o reconhecimento das distinções genéticas e funcionais, alterou-se, uma vez mais, a nomenclatura para *P. jirovecii*, em homenagem a Otto Jirovec, por descrever o organismo específico nos humanos [Helweg-Larsen, 2004].

Apesar de ser aceite pela comunidade científica como fungo, *P. jirovecii* apresenta várias características atípicas quando comparado com outros fungos patogénicos para o Homem. Entre diversos exemplos de diferenças fenotípicas e genéticas, encontra-se o facto de *P. jirovecii* possuir até duas cópias do gene 16S rRNA, quando comparado com a maioria dos

fungos que possuem centenas de cópias deste gene; e possuir colesterol em substituição do ergosterol na membrana celular, o que faz com que seja resistente à grande maioria dos fármacos antifúngicos, cuja acção incide na síntese do ergosterol. Estas características poderão ser a razão pelas quais, até ao momento, não se conseguiu encontrar qualquer parente próximo deste organismo, encontrando-se isolado, actualmente, na classe *Pneumocystidomycetes* [Stringer, 1996; Chinnappan & Lakshmi, 2011].

A classificação filogenética baseada na sequência do gene 16S rRNA de *P. jirovecii* sugere uma linhagem divergente do reino dos fungos, coincidente com a bifurcação dos *Basidiomycetes* e *Ascomycetes*. No entanto, a análise de outros genes como o dihidrofolato sintetase (DHFS), TS e  $\beta$ -tubulina, aproxima o género *Pneumocystis* a *Ascomycetes*, levando a que, em 2002, o *National Center of Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) propusesse a sua inclusão no reino dos Fungos, filo *Ascomycotina*, subfilo *Ascomycota*, classe *Pneumocystidomycetes*, ordem *Pneumocystidales* e família *Pneumocystidaceae* [Stringer, 1996; Redhead *et al.*, 2006].

## 2.1. Diversidade genética

Estudos de isolados de diferentes espécies de hospedeiros apresentaram características distintas no que diz respeito ao nível genético e fenótipo. Estas incluem a (i) especificidade para com o hospedeiro; (ii) diferença antigénica; (iii) mobilidade electroforética de enzimas e (iv) morfologia [Stringer, 1996].

Os modelos animais têm-se mostrado fundamentais no estudo da infecção de *Pneumocystis*, tanto na epidemiologia como na patologia. Diversos estudos, com o fim de avaliar a especificidade de *Pneumocystis* entre diferentes espécies de hospedeiro, confirmaram a impossibilidade de ocorrência de infecção cruzada, demonstrando, assim, a especificidade parasita-hospedeiro [Demanche *et al.*, 2001; Durand-Joly *et al.*, 2002; Aliouat-Denis *et al.*, 2008; Chinnappan & Lakshmi, 2011].

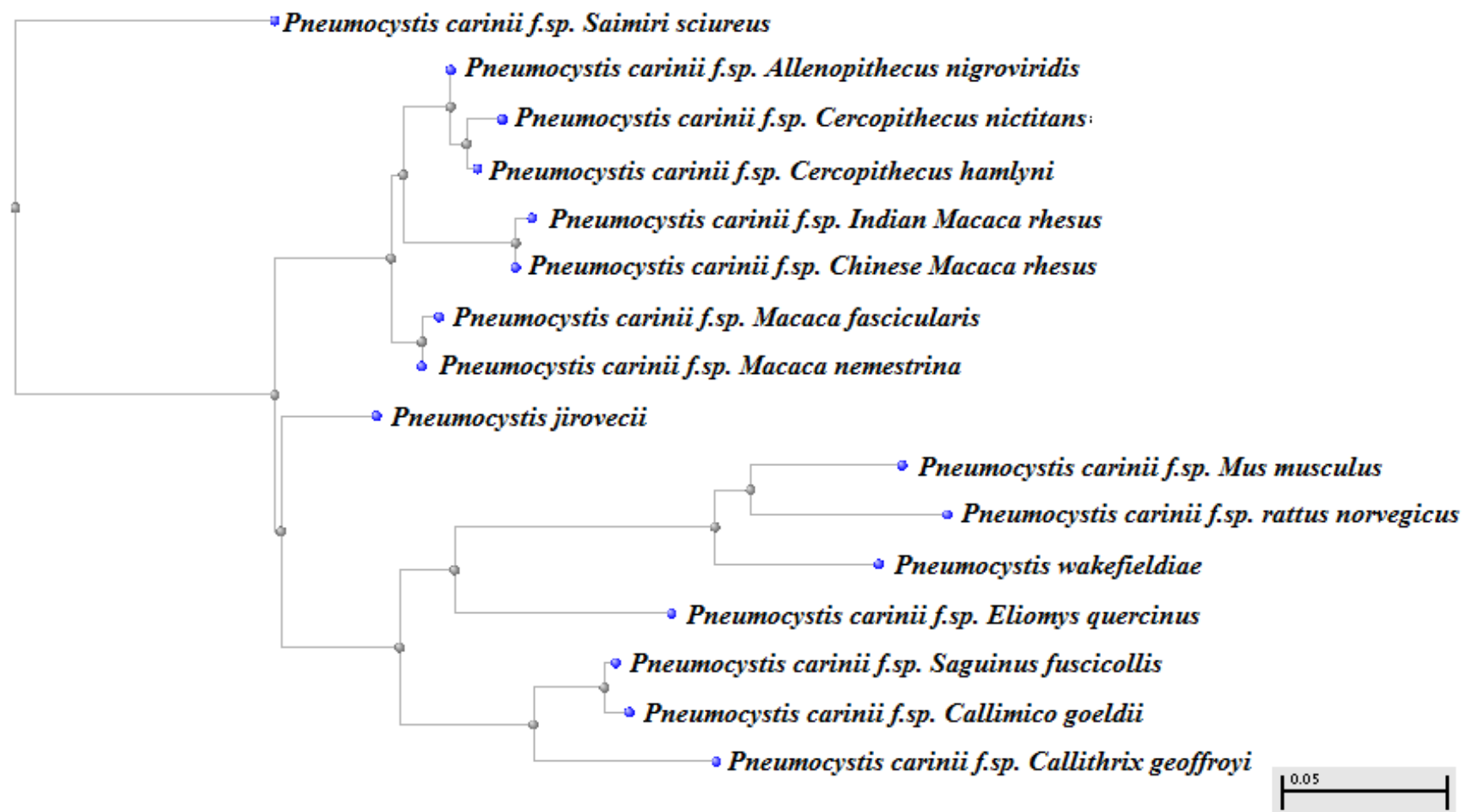
Através da análise genética comprovou-se que, dependendo do hospedeiro, os organismos de *Pneumocystis* apresentam diferenças em vários *loci*. Comparações filogénicas mostram um elevado nível de divergência de sequências nucleotídicas entre organismos em diferentes hospedeiros, nomeadamente no que diz respeito aos genes codificantes para: subunidade grande e pequena do rRNA mitocondrial (*mtLSU* e *mtSSU*), TS;  $\beta$ -tubulina e dihidropteroato sintetase (DHPS) [Helweg-Larsen, 2004]. Foi este reconhecimento que, em 1994, foi determinante para a distinção entre *P. carinii* f. sp. *Hominis*, responsável por infecções em humanos e *P. carinii* f. sp. *carinii*, uma das duas espécies que infectam ratos [Redhead *et al.*, 2006].

O desenvolvimento de vários *primers* por Ann Wakefield possibilitou a amplificação do DNA de todas as espécies de *Pneumocystis* actualmente conhecidas, permitindo novos e importantes desenvolvimentos [Wakefield, 1998]. Estudos recentes compararam os genes que codificam *mtLSU rRNA* e dihidropteroato sintetase (DHPS) de 18 primatas de diferentes espécies, onde as diferenças entre espécies de *Pneumocystis* variavam entre 2 a 28% [Demanche *et al.*, 2001]. Estas variações são significativamente superiores às verificadas entre outros fungos, por exemplo, comparando *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces rose* ou *Candida albicans* e *Candida tropicalis*, a divergência é de 1% e 1,3%, respectivamente. Mesmo entre alguns fungos de diferentes espécies, a divergência não é tão acentuada (6,6% entre *S. cerevisiae* e *C. albicans*) [Stringer, 1996].

Na sequência destas descobertas, em 1999, Frenkel propôs uma nova nomenclatura para os organismos que causam infecção em humanos – *P. jirovecii* – em honra ao parasitologista checo, Otto Jirovec, o primeiro investigador a classificar *Pneumocystis* como agente patogénico para o Homem [Stringer *et al.*, 2002; Gigliotti, 2005]. Esta nova denominação foi-se consolidando na comunidade científica e, em 2005, foi definitivamente adoptada no *International Code of Botanical Nomenclature*, distinguindo-se das demais designações para *Pneumocystis* nos restantes hospedeiros [Redhead *et al.*, 2006].

No dendrograma da **figura 1**, poderá observar-se a relação entre as sequências nucleotídicas do *mtLSU rRNA* de diferentes isolados aplicando o método de Neighbor Joining (NJ) à matriz de distância (distância entre todas as sequências do alinhamento múltiplo), construído com base na maior similaridade com *Pneumocystis jirovecii*.

Estas descobertas alteraram a visão convencional do modo de infecção, particularmente na especificidade para com o hospedeiro, transmissão, reservatórios ambientais e fontes de infecção [Calderón *et al.*, 2010].



**Figura 1.** Dendrograma representando a divergência entre as diferentes sequências nucleotídicas de isolados de *Pneumocystis* de diferentes espécies de hospedeiros. As sequências foram seleccionadas a partir da análise BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

### 3.Epidemiologia

Os primeiros casos de PPc reportados surgiram em orfanatos na Alemanha e Polónia durante a II Guerra Mundial. Entre os anos 20 a 40 do século XX, estes casos de pneumonia intersticial eram frequentes em crianças prematuras e mal nutridas [Morris *et al.*, 2004; Goldman *et al.*, 2005; Calderón *et al.*, 2010].

Em 1951, Vanek e Jirovec reconheceram o organismo P.j. em fotografias de microscopia de pulmões de crianças prematuras com pneumonia intersticial [Goldman *et al.*, 2005].

Esta doença, embora que rara, rapidamente se intensificou e disseminou pela Europa, apresentando o seu pico epidémico entre 1955 e 1959. No entanto, sem razão aparente, por volta de 1960, houve uma diminuição acentuada dos casos de PPc [Goldman *et al.*, 2005], sendo pouco reportada em doentes imunocomprometidos, submetidos a transplante de órgãos ou recebendo quimioterapia [Wakefield, 2002; De Souza & Benchimol, 2005; Calderón *et al.*, 2010]. Em meados de 1980, houve um *turnover* da incidência da PPc, de uma doença rara para uma pneumonia comum associada à pandemia do VIH. Por esta altura, a PPc era a doença definidora responsável pelo diagnóstico de dois terços dos casos de sida, sendo que aproximadamente 75% dos doentes com VIH desenvolveriam PPc ao longo da sua vida [Morris *et al.*, 2004].

Durante a década de 90, a introdução da TARV e da quimioprofilaxia anti-*Pneumocystis* reduziu substancialmente a frequência de PPc bem como de outras infecções oportunistas [Morris *et al.*, 2004; Calderón *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2011].

Apesar de no início do século XXI a incidência da PPc nos doentes VIH-positivos tenha diminuído nos países desenvolvidos, a sua prevalência nos países em desenvolvimento permanece elevada e subdiagnosticada, continuando a ser uma doença comum em indivíduos inconscientes da sua infecção pelo VIH, intolerantes ou sem acesso à terapia antiretroviral, ou nos casos de falha profilática [Calderón *et al.*, 2010].

Actualmente, o interesse na infecção por P.j. vai além da problemática dos doentes com sida. Com o aumento de doentes a receber terapias imunossupressoras, a PPc tem vindo a

tornar-se cada vez mais frequente nos indivíduos imunocomprometidos VIH-negativos [Calderón *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2011].

Outra área importante no estudo da epidemiologia da PPc é a determinação dos factores de predisposição para esta patologia, como a diminuição dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, mas também outros factores independentes, como as infecções virais e outros tipos de pneumonias concomitantes [Beard & Navin, 1996; Wu *et al.*, 2004; Chinnappan & Lakshmi, 2011].

## 4. Ciclo de vida

*Pneumocystis* possui um tropismo único para o pulmão, onde existe sem causar aparente patogenicidade. Em casos em que o sistema imunitário fica comprometido (imunodeficiência), dissemina e desenvolve uma infecção severa causando pneumonia intersticial que pode ser fatal [Thomas & Limper, 2004].

Nos últimos anos, as técnicas moleculares têm vindo a ajudar no avanço do conhecimento da biologia de *Pneumocystis*. Foram identificadas moléculas-chave do ciclo celular mitótico: arranjo da parede celular, existência de complexos sinaptonémios, cascatas de transdução de sinais e vias metabólicas. No entanto, continua a ser necessário o estabelecimento de um sistema de cultura para confirmar a função destas moléculas [Thomas & Limper, 2004; Aliouat-Denis *et al.*, 2009].

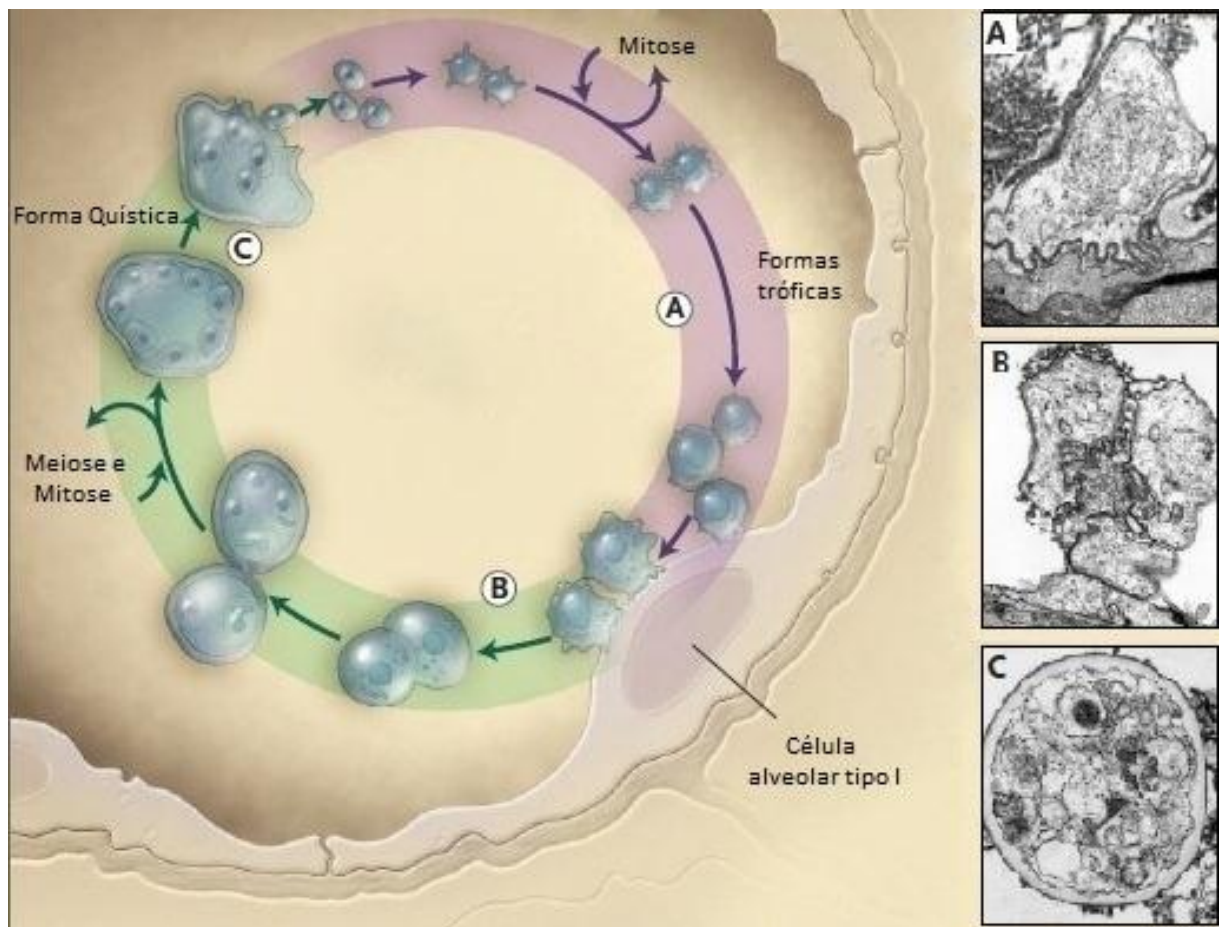
Apesar de ser possível a utilização de modelos animais, a especificidade do organismo para com o hospedeiro faz com que haja diferenças génicas consideráveis, sendo que, a actual informação disponível resulta, maioritariamente, de estudos histoquímicos e análises ultraestruturais efectuadas em amostras de tecido pulmonar, obtidos, *pós-mortem*, de roedores e alguns humanos infectados [Thomas & Limper, 2004].

Por microscopia electrónica, como se pode observar na **figura 2**, poderão ser identificadas duas formas principais do organismo: forma quística e forma trófica. A primeira possui uma parede rígida e oval com diâmetro entre 4 e 7  $\mu\text{m}$ , e poderá conter até oito corpos intraquísticos, quando madura, que se desenvolvem em formas tróficas após excitação. A forma trófica, encontrada na maioria das vezes em aglomerados, é por sua vez menor, entre 1 e 4  $\mu\text{m}$  de diâmetro, possui uma parede mais fina, e forma redonda ou elipsoide quando recém-libertada, e pleomórfica quando madura, possuindo projecções citoplasmáticas, denominadas por filopódias, responsáveis pela aderência do organismo aos pneumócitos de tipo I. Foi também identificada uma terceira forma deste organismo, pré-quisto ou quisto imaturo, que poderá representar uma fase intermédia da evolução da forma trófica na forma quística [Helweg-Larsen, 2004; Thomas & Limper, 2004; Aliouat-Denis *et al.*, 2009].



**Figura 2.** Quisto de *Pneumocystis* (C) imaturo contendo seis corpos intraquísticos; trofozoíto (T); fotografia obtida por microscopia electrónica X 16,000 [Sidhu, Cassai & Pei, 2003].

Até à data, o ciclo de vida de *Pneumocystis* não está completamente definido. Uma fase do ciclo, que ocorre nos pulmões do hospedeiro está bem documentada. Nesta fase são propostos dois modos de replicação: fase assexuada e fase sexuada (**Figura 3**). Até à data, não se conhecem fases do ciclo de vida de *Pneumocystis* fora do hospedeiro [Thomas & Limper, 2004; Aliouat-Denis *et al.*, 2009].



**Figura 3.** Hipótese do ciclo de vida para *Pneumocystis*. (A) Fotografia obtida por microscopia electrónica de uma forma trófica aderente ao epitélio alveolar (A). Durante a infecção, as formas tróficas são mais abundantes que os quistos, numa proporção aproximada de 9:1. (B) Fotografia obtida por microscopia electrónica de aglomerados de formas tróficas. Os eventos que ocorrem para a formação do quisto (C), ainda não são totalmente conhecidos, mas assume-se que a conjugação de duas formas tróficas resulta na maturação de um quisto (Adaptado de Thomas & Limper, 2004).

A proximidade de *Pneumocystis* com *Ascomycetes* torna provável a existência de padrões de diferenciação complexos [Helweg-Larsen, 2004]. Estudos ultraestruturais, assim como a recente descoberta do gene receptor de feromonas, Ste3, sugerem a existência de conjugação *in vivo*, das formas tróficas de *Pneumocystis* [Smulian *et al.*, 2001; Aliouat-Denis *et al.*, 2009].

Através da conjugação de duas formas tróficas haplóides, uma célula diplóide é formada. Posteriormente num processo de divisão meiótica seguida de replicação mitótica, forma-se um quísto imaturo que, conseqüentemente, dá origem a um quísto maduro, com oito corpos intraquísticos haplóides. Quando o quísto maduro lisa, são libertados os corpos intraquísticos que se desenvolvem em formas tróficas. Pensa-se que estas formas tróficas sofram replicação assexuada por fissão binária [Helweg-Larsen, 2004].

## 5. Infecção e transmissão

Tendo por base diversos estudos serológicos que detectaram anticorpos anti-*P. jirovecii* em crianças de tenra idade (até quatro anos), por muitos anos pensou-se que a PPC resultava de uma reactivação de uma infecção latente adquirida na infância, pelo que a doença desenvolver-se-ia no caso de o sistema imunitário se apresentar comprometido. Sabe-se, actualmente, que em indivíduos imunocompetentes, P.j. pode manter-se no pulmão sem causar sintomatologia, sendo a infecção eliminada ou controlada pelo sistema imunitário do hospedeiro [Wakefield, 2002; Thomas & Limper, 2004; Medrano *et al.*, 2005; Calderón *et al.*, 2010].

Estudos epidemiológicos e em modelos animais demonstraram que o hospedeiro consegue eliminar *Pneumocystis* do seu organismo, o que limita a teoria da infecção latente. No entanto, enquanto permanecem infectados, são fontes de transmissão do organismo para outros hospedeiros imunocompetentes ou para indivíduos cuja defesa imunitária se apresenta comprometida. Estes últimos poderão desenvolver PPC, aumentando a população de organismos de *Pneumocystis*. [Medrano *et al.*, 2005; Calderón, 2009]. Desta forma, os hospedeiros saudáveis são provavelmente factores importantes na transmissão entre indivíduos, comportando-se como um reservatório dinâmico do organismo [Chabé *et al.*, 2004; Aliouat-Denis *et al.*, 2008, Calderón *et al.*, 2010]. Muitos investigadores consideram os indivíduos colonizados com *Pneumocystis*, quando é detectado DNA ou o próprio organismo, em secreções pulmonares de indivíduos sem sintomas nem sinais de pneumonia. Estas ideias suportam a teoria de que, na grande maioria dos casos, a infecção é adquirida *de novo* [Wakefield, 2002; Matos *et al.*, 2006; Chinnappan & Lakshmi, 2011].

Em algumas investigações, aplicando técnicas moleculares mais sensíveis e específicas, foi possível verificar que os padrões de distribuição das frequências alélicas de isolados de P.j. estão mais relacionados com o local de diagnóstico do que com o local de nascimento. Em doentes com infecções recorrentes por P.j. foi demonstrado que o microrganismo apresenta diferentes genótipos, sendo estes casos interpretados como reinfecções. A possibilidade de reinfecção é também sugerida pelo aumento do número de mutações que provocam alterações nas sequências do gene DHPS [Beard *et al.*, 2004; Stringer *et al.*, 2002; Singhal *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2006].

Estudos apontam para que o principal meio de transmissão de P.j. seja pela via aérea, entre hospedeiros, no entanto, o modo exacto de transmissão permanece por estabelecer [Helweg-Larsen, 2004; Aliouat-Denis *et al.*, 2009]. Ainda não é claro se P.j. é, efectivamente, um parasita obrigatório, propagando-se especificamente no hospedeiro, ou se é capaz de se reproduzir num nicho ambiental, mas considera-se que a sua colonização é uma fase importante no ciclo celular. Apesar de existirem estudos que identificaram DNA de P.j. em amostras de filtros de ar hospitalares, zonas urbanas e rurais e em lagos, não foram identificadas formas do organismo por microscopia, permanecendo a incerteza da existência de um nicho ecológico de *Pneumocystis* fora dos hospedeiros. Além do mais, tendo em conta a sua especificidade, a hipótese de transmissão por outra espécie diferente de hospedeiro é excluída [Wakefield, 1996; Aliouat-Denis *et al.*, 2009; Calderón, 2009].

## 6.Fisiopatologia

Após inalação, *Pneumocystis* (parasita extracelular) penetra na cavidade pulmonar e adere às células alveolares por um exsudado rico em trofozoítos, levando ao espessamento da membrana alveolar e a inflamação dos alvéolos e ductos alveolares com consequente edema e fibrose. É então que se dá a replicação assexuada e a adesão às células alveolares de superfície tipo I. A aderência é mediada pelas glicoproteínas major de superfície (MSG), presentes na superfície da parede celular do microrganismo, e responsáveis pela ligação específica que se estabelece com os macrófagos do hospedeiro [Pottratz *et al.*, 1991; Benfield *et al.*, 1997].

A resposta inflamatória efetora é necessária para controlar a pneumocistose. No entanto, a inflamação exuberante durante a infecção promove danos pulmonares severos, caracterizados pela inflamação pulmonar neutrofílica, que pode conduzir a um dano alveolar difuso ou insuficiência respiratória. De facto, as complicações respiratórias ou, nos casos mais severos, a morte, correlacionam-se mais com o grau de inflamação pulmonar do que com a carga parasitária, embora ambos os factores possam estar correlacionados [Thomas & Limper, 2004].

A resposta imunológica dirigida a P.j. envolve interações complexas entre linfócitos T CD4<sup>+</sup>, neutrófilos e mediadores solúveis, como as citocinas (TNF) e quimiocinas (MIP-2) libertadas pelos macrófagos alveolares, que facilitam o controlo da infecção. Em particular, a actividade das células T CD4<sup>+</sup> são de extrema importância na defesa contra este organismo, em que o risco de infecção aumenta nos casos em que a contagem de T CD4<sup>+</sup> é inferior a 200 células/mm<sup>3</sup>, nos doentes seropositivos para VIH, e 400 células/mm<sup>3</sup> nos demais. Estas, são células memória que medeiam as respostas inflamatórias, recrutando e activando outras células imunológicas efectoras, incluindo os monócitos e macrófagos. Considera-se que são necessários o TNF- $\alpha$  do macrófago e a interleucina 1 (IL-1) para iniciar a resposta mediada pelas células T CD4<sup>+</sup> [Steele *et al.*, 2003; Thomas & Limper, 2004; Wang *et al.*, 2011].

Os macrófagos alveolares possuem também um papel importante na imunidade inata e adaptativa nos pulmões, sendo mediadores inflamatórios de extrema importância durante a PPC. Um dos receptores destas células é a Dectina-1, que reconhecendo o  $\beta$ -glucano, principal componente da parede celular de P.j., vai mediar a eliminação do microrganismo. Estudos em roedores resultaram numa libertação acentuada de citocinas e quimiocinas pelos macrófagos alveolares, aquando do reconhecimento do  $\beta$ -glucano, sendo que, em contrapartida, quando inibido este reconhecimento, a capacidade imunológica tornou-se ainda mais debilitada [Lebron *et al.*, 2003; Steele *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2011].

## 7. Tratamento e profilaxia

Em 1978, introduziu-se um regime terapêutico efectivo que consiste na administração de Trimetoprim-Sulfametoxazol (TMP-SMX) durante um período de três semanas, que, desde então, se mantém como o tratamento padrão para a PPc. Apesar de frequentemente apresentar toxicidade, quando comparado com as alternativas como a pentamidina, dapsona-trimetoprim, clindamicina-primaquina ou atovaquona, o TMP-SMX demonstra um efeito mais activo com equivalente ou menor toxicidade. No entanto, deve ser considerada a necessidade de desenvolvimento de novos agentes profiláticos e terapêuticos para a PPc [Helweg-Larsen, 2004; Esteves *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2011].

Actualmente, este fármaco é utilizado para um grande espectro de infeções, aumentando a probabilidade de ocorrência de fenómenos de resistência. Se não existirem novos fármacos alternativos, o número de doentes com infeções oportunistas resistentes, incluindo a PPc, possivelmente vai tender a aumentar. Diversos autores encontraram mutações em genes específicos de *P.j.* em resposta a regimes de tratamento anti-*Pneumocystis* com sulfonamidas [Morris *et al.*, 2004]. Outros estudos determinaram a existência de mutações ao nível do gene DHPS em doentes a receber tratamento profilático com TMX-SMX. A DHPS é uma enzima associada a resistências às sulfas em diversos organismos, incluindo protozoários como *Plasmodium falciparum* e bactérias como *Streptococcus pneumoniae*, existindo, também, a possibilidade de ocorrência de resistências a este tipo de tratamento para a PPc [Nahimana *et al.*, 2004].

A maioria dos fármacos utilizados como profilaxia e tratamento para a PPc têm como alvos, enzimas envolvidas na biossíntese do ácido fólico (FAS) privando as células de folatos essenciais para a sua proliferação. Os fármacos da família das sulfas, como o Sulfametoxazol (SMX) e a dapsona (D), inibem a acção da DHPS, por seu lado, o trimetoprim (TMP) inibe a DHFR, ambas enzimas componentes da via do ácido fólico [Nahimana *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2006; Moukhliis *et al.*, 2010]

Actualmente, o Centro de Controlo e Prevenção de Doenças (CDC, E.U.A.) recomenda a iniciação da profilaxia primária para a PPc nos doentes que apresentam contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> inferiores a 200 células/mm<sup>3</sup> (doentes seropositivos para VIH) e inferiores a 400 células/mm<sup>3</sup> (doentes seronegativos para VIH); histórico de candidíase

orofaríngea, outras infecções oportunistas indicadoras de imunossupressão, ou febre de etiologia desconhecida; e descontinuação da profilaxia nos indivíduos que respondem à TARV apresentando um aumento na contagem das células T CD4<sup>+</sup> para valores superiores a 200 ou 400 células/mm<sup>3</sup> durante mais de três meses, sendo eventualmente retomada caso estes valores se invertam [Thomas & Limper, 2004; Helweg-Larsen, 2004; Heffelfinger *et al.*, 2009; Calderón *et al.*, 2010].

Recomenda-se a iniciação da profilaxia secundária aos doentes com episódios anteriores de PPc, num regime profilático vitalício. No entanto, pode ser descontinuada no caso de estabilização dos níveis de linfócitos CD4<sup>+</sup> durante, pelo menos, três meses. Na eventualidade de um novo episódio de PPc, em que as contagens de linfócitos CD4<sup>+</sup> são superiores a 200 células/mm<sup>3</sup>, é prudente a continuação vitalícia da profilaxia [Calderón *et al.*, 2010].

## 8. Diagnóstico

### 8.1. Apresentação clínica

Apesar dos avanços na tecnologia utilizada, o diagnóstico da PPc continua a apresentar dificuldades, devido à inespecificidade dos sintomas e à ocorrência de possíveis infecções simultâneas com múltiplos organismos. Os doentes com PPc normalmente desenvolvem dispneia, tosse não produtiva, ou produtiva com expectoração incolor e. No entanto, esta apresentação clínica é variável e semelhante a outras patologias [Calderón *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2011].

Para além da sintomatologia, o quadro clínico é baseado em exames radiológicos, gasimetria arterial e testes laboratoriais inespecíficos. Os exames radiológicos de doentes com PPc apresentam, normalmente, um padrão de infiltrado intersticial difuso e bilateral. A pressão parcial do oxigénio ( $\text{PaO}_2$ ) no sangue periférico inferior a 65 mmHg é sugestiva de PPc, assim como valores de  $\text{CD4}^+$  inferiores a 200 células/ $\text{mm}^3$  (doentes seropositivos para VIH) e inferiores a 400 células/ $\text{mm}^3$  (doentes seronegativos para VIH). Outras análises laboratoriais, como a medição dos níveis séricos de lactato desidrogenase (LDH), que é libertada quando ocorre destruição da membrana citoplasmática das células do hospedeiro, reflectem os danos do parênquima pulmonar, podendo ser úteis na avaliação da evolução e extensão da doença [Dei-Cas *et al.*, 1998; Wakefield, 2002; Calderón *et al.*, 2010].

Os doentes imunocomprometidos, seronegativos para VIH, normalmente têm um desenvolvimento mais rápido da PPc do que os VIH-positivos, apresentando-se como uma infecção aguda e causando severas dificuldades respiratórias que, frequentemente, requerem ventilação mecânica nos primeiros dias. No caso dos doentes VIH-positivos, é mais difícil diagnosticar a PPc, pois os sintomas aparecem tardiamente e, na maioria das vezes, disfarçados pela TARV. Nas crianças, esta doença evolui discretamente, apresentando dispneia progressiva, cianose, anorexia, perda de peso e diarreia, sendo que a febre e tosse não produtiva poderão estar ausentes [Calderón *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2011].

## 8.2. Diagnóstico definitivo

Devido à inespecificidade do quadro clínico e do risco de toxicidade do tratamento, é de extrema importância a confirmação do diagnóstico de PPc. O método *standard* internacional para o diagnóstico da PPc consiste na visualização microscópica de P.j. em secreções pulmonares. Como o microorganismo afecta os alvéolos pulmonares, o tracto respiratório superior possui baixa carga parasitária, pelo que são necessárias secreções do tracto respiratório inferior para um diagnóstico definitivo, mais sensível e eficaz [Helweg-Larsen, 2004; Hauser *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2011]. O lavado broncoalveolar (LBA) combinado com a coloração histoquímica e/ou imunofluorescência, são considerados os métodos de escolha, apresentando sensibilidades e especificidades que podem ser superiores a 95%. Em alternativa, poderá utilizar-se a espectoração induzida (EI), sendo a sensibilidade dependente do seu processo de obtenção, variando entre 50 e 90%. No entanto, as técnicas de microscopia são limitadas pela sua sensibilidade, especificidade e procedimentos [Boer *et al.*, 2010]. Por vezes, é necessário efectuar uma biopsia ao pulmão dos pacientes imunocomprometidos, VIH-negativos, devido à baixa carga parasitária quando comparado com os pacientes com sida [Helweg-Larsen, 2004].

O diagnóstico clássico baseia-se na observação microscópica de P.j. em secreções pulmonares utilizando técnicas de coloração histoquímica, como a metenamina prata (GMS), azul de toluidina ou calcoflúor, que coram a parede dos quistos, ou a coloração pelo Giemsa, que cora os trofozóitos e os corpos intraquísticos. Estas técnicas de simples execução, exceptuando a GMS, são pouco específicas, corando em simultâneo outros microorganismos, dependendo o diagnóstico de um técnico experiente e do tipo de amostra disponível. Por outro lado, podem-se utilizar colorações imuno-específicas como a imunofluorescência directa/indirecta com anticorpos monoclonais, sendo este método mais específico e sensível, embora que mais oneroso e moroso [Ng *et al.*, 1990; Calderón *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2011].

### 8.3. Diagnóstico molecular

Normalmente, nos casos em que as secreções pulmonares apresentam números insuficientes de organismos de P.j. para possibilitar o diagnóstico por microscopia, a sensibilidade da PCR permite a sua detecção, principalmente nos casos VIH-negativos [Matos *et al.*, 2001; Helweg-Larsen, 2004; Hauser *et al.*, 2011].

A PCR de diagnóstico foi introduzida experimentalmente em 1990, quando Ann Wakefield e a sua equipa descreveram pela primeira vez a amplificação do gene RNA ribossomal mitocondrial. Desde então, diversos estudos têm vindo a utilizar a técnica de PCR para detecção do DNA de *Pneumocystis* em secreções pulmonares. De modo a aumentar a sensibilidade desta técnica de diagnóstico, diferentes protocolos de PCR têm sido estudados, incluindo escolha de diferentes genes alvo e a utilização da PCR *nested*, em que num segundo ciclo de PCR, reamplifica-se o produto da PCR primária [Sing *et al.*, 2000; Helweg-Larsen, 2004; Hauser *et al.*, 2011]. Este método é frequentemente utilizado para a amplificação do gene *mtLSU rRNA* de P.j., havendo, actualmente, outras sequências-alvo, como a MSG, TS e DHFR. É importante referir a dificuldade na comparação entre estudos devido aos diferentes contextos clínicos, métodos de recolha de amostras, reagentes e técnicas laboratoriais utilizadas na extracção do DNA, amplificação ou análise dos resultados [Matos *et al.*, 2001; Calderón *et al.*, 2010].

Uma questão levantada com esta técnica molecular é a interpretação de resultados positivos por PCR, mas negativos por microscopia. Estes podem ser indivíduos colonizados ou doentes com PPC, sendo difícil distinguir ambos os casos. Uma análise cuidadosa da condição do doente, no que se refere aos sintomas, radiograma do tórax e análise laboratorial, é extremamente importante na decisão final, de modo a evitar o aprecimento de falsos positivos. Alguns investigadores testaram os ensaios quantitativos de PCR em tempo real para distinguir os diferentes casos, no entanto, atribuir um valor *cut-off* de número de cópias do gene está dependente de várias condições, como o tipo de amostra, modo de obtenção e o tipo de imunodeficiência do doente. Outra ocorrência de falsos-positivos deve-se ao facto de a sensibilidade da técnica de PCR detectar organismos viáveis e não viáveis, no entanto, esta probabilidade pode ser reduzida com a utilização de várias sequências-alvo em simultâneo [Sing *et al.*, 2000; Helweg-Larsen, 2004; Calderón *et al.*, 2010; Samuel *et al.*, 2011].

Estudos mais recentes têm vindo a avaliar a associação entre genótipos específicos de P.j. e a virulência, susceptibilidade aos fármacos e outras características das estirpes do parasita [Matos *et al.*, 2003; Esteves *et al.*, 2011].

#### **8.4. Métodos de diagnóstico complementares**

Como a obtenção de amostras de LBA é um processo invasivo e desconfortável, diversos autores têm dado ênfase a técnicas menos invasivas para o diagnóstico da PPc, em especial, métodos que utilizem amostras de fácil obtenção e menos onerosas, como o sangue. Como tal, há a necessidade de desenvolver testes serológicos mais sensíveis e específicos para o diagnóstico da PPc, particularmente quando não é possível proceder à obtenção de amostras invasivas, dadas as condições específicas dos doentes. A broncofibroscopia para obtenção de LBA é difícil de efectuar ou repetir em doentes com PPc que apresentem insuficiência respiratória, ou em crianças [Tasaka *et al.*, 2007; Boer *et al.*, 2010].

No sangue, por exemplo, circulam moléculas necessárias às células, assim como produtos libertados por estas. É comum, na maioria das patologias, existir variações nos níveis basais de determinadas moléculas em circulação. O estudo destas alterações poderá ser útil no auxílio ao diagnóstico da PPc. Diversos biomarcadores serológicos foram propostos para avaliação da sua capacidade de distinção entre a PPc e outras condições/patologias pulmonares, como, por exemplo, (1→3)-β-D-glucano, Lactato desidrogenase (LDH), *Krebs von den Lungen* (KL-6) e S-adenosilmetionina (SAM), em que os dois últimos serão alvos de estudo no decorrer deste trabalho [Tasaka *et al.*, 2007; Nakamura *et al.*, 2009; Boer *et al.*, 2010; Caldeón *et al.*, 2010].

## 9. Quantificação de S-Adenosilmetionina e KL-6 pelo ensaio de ELISA

### 9.1. Krebs von den Lungen (KL)-6

A proteína *Krebs von den Lungen-6*, ou KL-6, é uma cadeia glicosilada de elevado peso molecular (120-200 kDa, dependendo da região variável), constituinte da mucina-1 humana (MUC-1). As mucinas são proteínas essenciais na formação de barreiras protectoras nas superfícies epiteliais e na sinalização celular. A MUC-1, em especial, inibe ou promove a adesão entre as células epiteliais e possui um efeito imunomodulador, influenciando directa ou indirectamente a via apoptótica [Imai *et al.*, 2002; Shimizu *et al.*, 2009; Briassoulis *et al.*, 2003; Shigemura *et al.*, 2012].

Classificada como *cluster* 9 (MUC-1), de acordo com a classificação proposta no *Third International Workshop on Lung Tumor and Differentiation Antigens*, a KL-6 foi descoberta por Kohno *et al.*, em 1986, por ser um antigénio relacionado com o adenocarcinoma pulmonar que é libertado na corrente sanguínea, no caso de lesão pulmonar, pelas células epiteliais dos bronquíolos lesados e pelos pneumócitos do tipo II em regeneração [Imai *et al.*, 2002; Okada *et al.*, 2009].

É normal que os níveis séricos de KL-6 sejam elevados em várias patologias respiratórias e mesmo noutras doenças não respiratórias, tais como cancro de mama e pâncreas, e a *diabetes mellitus*. No entanto, a maior atenção tem-se centrado no KL-6 como uma ferramenta de diagnóstico e prognóstico de doenças respiratórias [Okada *et al.*, 2009]. Diversos estudos sugerem a sua sensibilidade como biomarcador para diversas doenças pulmonares intersticiais, incluindo a fibrose pulmonar idiopática (FPI), sarcoidose pulmonar e pneumonias com dano alveolar difuso ou padrão de pneumonia intersticial crónica [Shimizu *et al.*, 2009; Ohshimo *et al.*, 2009]. O aumento da concentração de KL-6 na corrente sanguínea deve-se ao aumento da permeabilidade da barreira capilar alveolar. O epitélio alveolar é composto por dois tipos de células: os pneumócitos do tipo I e tipo II [Hirasawa *et al.*, 1997]. Actualmente sabe-se que as formas tróficas de P.j. aderem aos pneumócitos do tipo I, responsáveis pelas trocas gasosas entre os vasos capilares e os alvéolos pulmonares, levando à inflamação e hipertrofia dos pneumócitos do tipo II e hipoxemia do doente [Cushion, 2004].

Em 2002, os resultados de um estudo conduzido no Japão, confirmaram a medição dos níveis séricos de KL-6 como indicador sensível para a severidade da pneumonia intersticial no adulto, sendo actualmente utilizado nesse país, como complemento ao diagnóstico de pneumonia intersticial activa [Imai *et al.*, 2002; Shimizu *et al.*, 2009].

A necessidade de distinguir entre casos colonizados e doentes com PPc foi também analisada utilizando o KL-6. Shimizu *et al.* (2009) avaliaram os níveis de KL-6 em doentes com PPc e doentes com outras patologias pulmonares, colonizados com P.j., com e sem administração de corticosteróides. Apesar de concluírem que a administração de corticosteróides poderá ser um factor de risco para colonização por P.j., os seus resultados não possibilitaram a distinção entre casos PPc e colonizados [Shimizu *et al.*, 2009].

## **9.2. S-adenosilmetionina (SAM)**

A S-adenosilmetionina, também referida por SAM ou AdoMet, possui um importante papel nos processos biológicos de metilação em todos os organismos, servindo como dador do grupo metil utilizado na modificação covalente do DNA e proteínas [Watson *et al.*, 1999; Song *et al.*, 2003]. É produzida pela metionina adenosil transferase (MAT), também designada por S-adenosilmetionina sintetase, a partir de uma molécula de metionina e outra de adenina trifosfato (ATP) [Song *et al.*, 2003]. Em contraste com a maioria dos outros microrganismos capazes de causar doenças em humanos, *Pneumocystis* aparenta ser extremamente dependente de SAM exógena, apesar de existirem publicações que contradizem essa necessidade [Kutty *et al.*, 2008]. No caso da pneumocistose, contrariamente à elevada concentração intracelular, a concentração de SAM extracelular apresenta-se substancialmente inferior [Boer *et al.*, 2010].

Proposta, em 2003, como um biomarcador bioquímico, a quantificação dos níveis de SAM no soro foi recentemente reintroduzida como um promissor teste de diagnóstico para a PPc em doentes VIH-positivos [Skelly *et al.*, 2008; Boer *et al.*, 2010]. No entanto, estudos recentes foram incapazes de distinguir os níveis séricos de SAM entre doentes com e sem PPc [Boer *et al.*, 2011].

### 9.3. Ensaio imunoenzimático - ELISA

O *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) consiste num método extremamente eficaz para detecção e quantificação de uma proteína específica numa mistura complexa. Descrito, pela primeira vez, por Eva Engvall e Peter Perlmann [Engvall & Perlmann, 1971], é um método que possibilita a análise de amostras de proteínas, imobilizadas em microplacas através anticorpos específicos. Esta técnica é normalmente utilizada em laboratórios de investigação, mas também possui aplicações comerciais, incluindo a detecção de marcadores de doença e/ou infecção [Occurrences *et al.*, 2010].

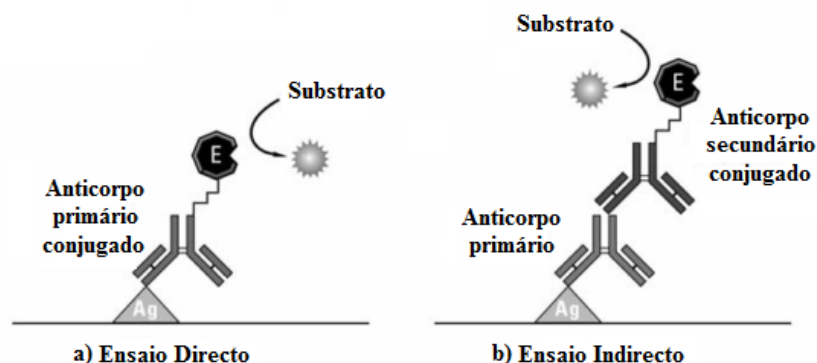
Num ensaio típico, formulado para detecção de um antígeno numa mistura proteica complexa, o antígeno é imobilizado ou adsorvido através de um anticorpo no fundo dos poços de uma microplaca, colocando-se um anticorpo específico. A detecção do anticorpo pode ser feita sob diferentes métodos:

#### a) Ensaio directo.

O ensaio directo (**figura 4a**) é o método ELISA mais simples e rápido, pois apenas se utiliza um tipo de anticorpo, requerendo menos passos no procedimento. É utilizado para testar reacções específicas entre anticorpo-antígeno. Neste caso, o antígeno presente na amostra é adsorvido directamente na microplaca. Seguidamente, introduz-se um anticorpo monoclonal conjugado com uma enzima específico para o antígeno, que vai emitir sinal (neste caso, alteração na coloração), na presença do substrato enzimático.

#### b) Ensaio indirecto.

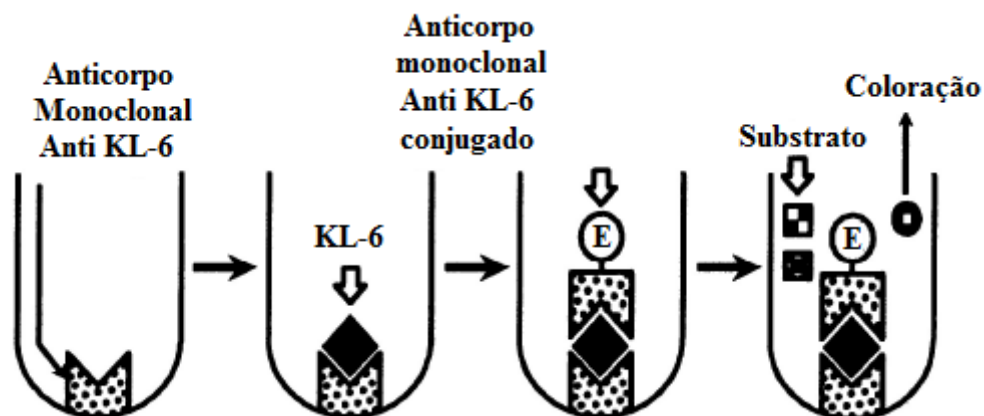
O ensaio indirecto (**figura 4b**) trata-se de um método com maior especificidade do que o ensaio directo e é utilizado na pesquisa de um determinado anticorpo numa amostra de soro. Para tal, o seu antígeno é adsorvido na microplaca para que quando se adiciona a amostra, o anticorpo se ligue especificamente ao antígeno. Neste caso, sendo uma amostra de anticorpos humanos (geralmente IgG ou IgM), na sua detecção utiliza-se um outro anticorpo (anti-IgG ou anti-IgM) conjugado com uma enzima que, tal como no ensaio directo, vai emitir sinal (alteração na coloração), na presença do seu substrato.



**Figura 4.** Esquema dos formatos ELISA mais comuns (Adaptado de Occurrences, 2010).

**c) Ensaio “sandwich”.**

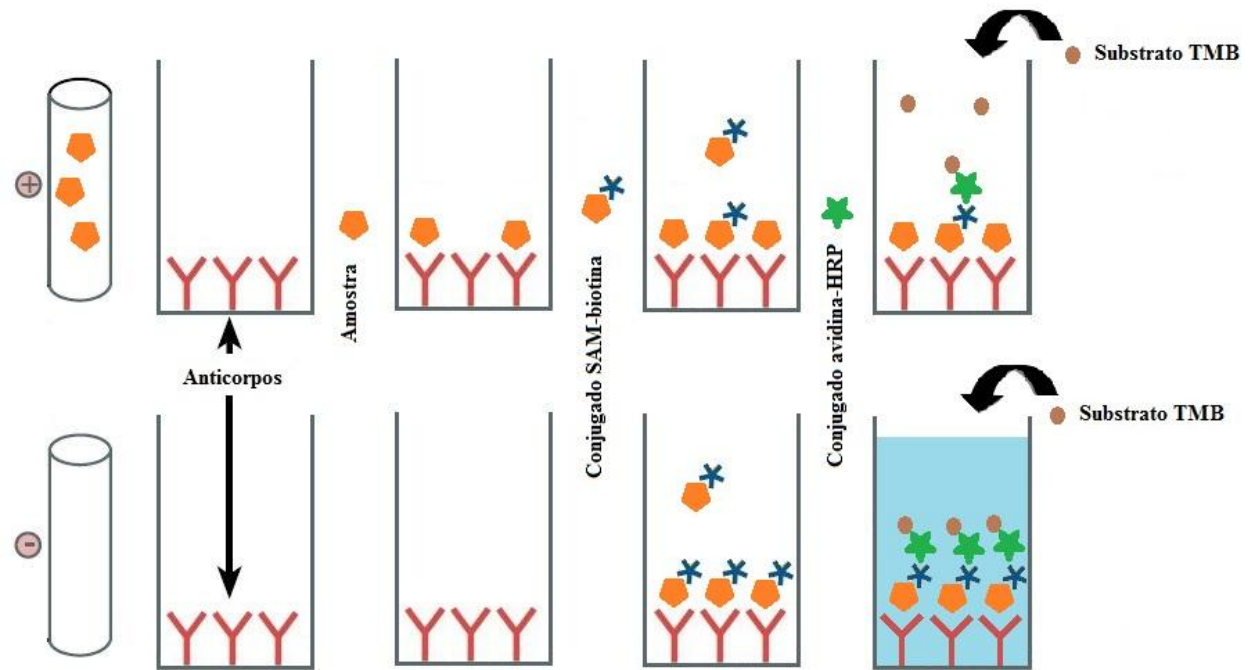
O método utilizado no decorrer deste trabalho para quantificação do KL-6 é um ensaio ELISA “sandwich” que utiliza um anticorpo monoclonal primário específico para o KL-6, um anticorpo secundário marcado com uma enzima e o seu substrato. Como se pode verificar na **figura 5**, este procedimento envolve quatro passos principais: no primeiro, o KL-6 presente na amostra liga-se ao anticorpo primário presente na microplaca; seguidamente, é adicionado o anticorpo secundário marcado com uma enzima que se vai ligar ao KL-6, formando o efeito “sandwich”; no terceiro passo é adicionado o substrato enzimático, que sendo decomposto, emite coloração; por fim, efectua-se a medição da absorvância comparando com a recta padrão [Eitest KL-6 ELISA kit, EIDIA Co., Ltd; Japão].



**Figura 5.** Esquema do princípio da reacção do método ELISA “sandwich”, utilizado no decorrer do presente estudo (Adaptado de Eitest KL-6 ELISA kit, EIDIA Co., Ltd; Japão).

#### **d) Ensaio competitivo.**

Este método (**figura 6**) foi utilizado para determinar os níveis serológicos de SAM. Para tal, numa microplaca revestida com anticorpos específicos para a SAM, introduz-se a amostra e, em simultâneo, uma quantidade fixa de conjugado SAM-biotina. A SAM presente na amostra vai competir com o conjugado pela ligação ao anticorpo presente na microplaca. Seguidamente, introduz-se uma quantidade fixa de um conjugado avidina-HRP. A conjugação com biotina resulta num anticorpo com múltiplos locais de ligação da avidina, levando a um aumento de moléculas enzimáticas no complexo e, consequentemente, a obtenção de um sinal mais acentuado. Este sinal é visualizado após adição do substrato da peroxidase HRP, determinado por espectroscopia, cujo resultado é inversamente proporcional à quantidade de SAM presente na amostra [General S-Adenosyl Methionine, SAM ELISA Kit, Wuhan EIAab Science Co., Ltd.; China].



**Figura 6.** Esquema de um ensaio ELISA competitivo (adaptado de: <http://www.elisa-antibody.com/index.php?page=competitive-elisa>).

Para a detecção enzimática, o substrato enzimático apropriado é adicionado, sendo o sinal observado de forma proporcional à quantidade de antígeno na amostra, excepto no método competitivo, no qual sucede o inverso. A lavagem entre passos é extremamente importante para garantir que apenas as moléculas com maior afinidade serão quantificadas no final do procedimento [Occurrences *et al.*, 2010].

## **10. Material e métodos**

### **10.1. Objecto de estudo**

No presente estudo pretende-se investigar de que forma os níveis séricos de KL-6 e SAM, poderão ser indicadores fidedignos, sensíveis e específicos para o diagnóstico de PPc.

### **10.2. Caracterização da população em estudo**

De um grupo definido por doentes imunocomprometidos, com sintomatologia respiratória, com diferentes características clínicas, foram escolhidas aleatoriamente 145 amostras sanguíneas e pulmonares, provenientes de hospitais da cidade de Lisboa, submetidas para diagnóstico de PPc na Unidade de Parasitologia Médica, Grupo de Protozoários Oportunistas/VIH e Outras Protozooses, do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, entre Janeiro de 1995 e Novembro de 2012, e que respeitavam os critérios de inclusão do presente estudo. As secreções pulmonares estudadas dividiram-se em: 78 lavados broncoalveolares (LBA), 60 expectorações induzidas (EI), 5 lavados orais (LO) e 2 secreções brônquicas (SB) testadas para P.j. através do diagnóstico parasitológico e/ou molecular. A média de idades dos doentes foi de 38 anos, num intervalo de idades entre 9 meses e 68 anos, sendo a percentagem de doentes do sexo masculino e feminino, 68% e 32%, respectivamente.

Amostras de 37 dadores de sangue foram escolhidas aleatoriamente para controlo dos níveis serológicos de KL-6 e SAM.

### **10.3. Informação clínica**

De forma a se poder averiguar a existência de potenciais associações entre os parâmetros da doença e os níveis serológicos dos biomarcadores em estudo, procedeu-se à recolha de dados relativos à contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e diagnóstico clínico de PPc, sendo de referir que o presente projecto de investigação foi submetido e aprovado pelos concelhos de ética das instituições envolvidas.

**Diagnóstico clínico compatível com PPc.** Foi considerado caso clínico de PPc, na presença de pelo menos duas das seguintes variáveis: sintomas, tais como, tosse não produtiva, febre e dispneia; radiograma do tórax sugestivo de PPc; PaO<sub>2</sub> no sangue periférico inferior a 65 mmHg.

**Contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup>.** A contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> permitiu a distinção e agrupamento dos doentes com base no seu estado imunitário, e no respectivo risco de desenvolverem a infecção. Como tal, foram divididos em três grupos: a) grupo de baixo risco (mais de 200 células/mm<sup>3</sup>); b) grupo de risco moderado (entre 51 e 200 células/mm<sup>3</sup>); c) grupo de risco elevado (menos de 50 células/mm<sup>3</sup>).

**Definição de caso de PPc.** Um episódio de pneumocistose foi definido como um caso com quadro clínico compatível com PPc, com P.j. identificado por técnicas parasitológicas (IFI/AcM), ou pela detecção do DNA de P.j. por PCR *nested* nas secreções pulmonares.

**Apresentação atípica de PPc.** Corresponde a um episódio, durante o qual, se detecta P.j. por IFI/AcM e/ou por PCR *nested*, em doentes com quadro clínico atípico, isto é, sem quadro clínico compatível com PPc.

**Infecção subclínica ou portador assintomático de P.j.** Caso com reduzida carga parasitária, onde P.j. é identificado, apenas, por PCR *nested*, nas secreções pulmonares, sem apresentação de quadro clínico sugestivo de PPc.

## **10.4. Processamento das amostras**

### **10.4.1. Amostras de sangue**

Imediatamente após a sua recepção, de modo a evitar a ocorrência de hemólise, as amostras de sangue foram colocadas num tubo e centrifugadas a 2300 g (Modelo: Kubota 4000; Kubota Corporation), durante 10 minutos. Seguidamente, distribuiu-se cautelosamente o soro em *eppendorfs* de 1,5 mL e armazenou-se a -80°C para posterior utilização.

### **10.4.2. Secreções pulmonares**

As secreções pulmonares (EI, LBA, LO e SB) foram devidamente identificadas e imediatamente processadas, segundo os procedimentos abaixo descritos.

#### **10.4.3. Expectoração induzida (EI).**

Inicialmente adicionou-se à amostra um volume igual de ditiotreitól a 0,1% (Sigma-Aldrich®), um agente químico mucolítico que tem como função dissolver e solubilizar as partículas e agregados do muco. Agitou-se vigorosamente, até homogeneizar por completo a mistura e colocou-se na estufa (Heraeus) durante 30 minutos a 37°C, para que o ditiotreitól actuasse. A amostra liquefeita foi, então, transferida para um tubo de centrífuga, ao qual se adicionou tampão fosfato salino (PBS, BioMérieux), até preencher o volume do tubo, levando-se a centrifugar a 4100 g (modelo: Kubota 4000; Kubota Corporation), durante 20 minutos. O PBS actua como um tampão estabilizante e a centrifugação serve para concentrar e sedimentar as células de P.j.. Rejeitou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se o sedimento em 0,5mL de PBS e realizaram-se três esfregaços em lâminas de microscopia pré-tratadas com poli-L-lisina (Menzel Glaser – Thermo Scientific). Deixaram-se secar, à temperatura ambiente (no interior de uma câmara de fluxo laminar), dividindo-se o restante volume da amostra em *eppendorfs* de 1,5mL. Quando secos, os esfregaços foram fixados em acetona (Panreac Química S.L.U.), durante 10 minutos, à temperatura ambiente.

#### **10.4.4. Lavado broncoalveolar (LBA).**

Este protocolo é bastante semelhante ao apresentado no ponto “10.3.2.1. Expectoração induzida (EI)”, no entanto, como as amostras de LBA, normalmente, não apresentam muco, o processamento iniciou-se colocando a amostra directamente num tubo de centrífuga, perfazendo-se o volume do tubo com PBS (BioMérieux) e centrifugando-se a 4100 g (modelo: Kubota 4000; Kubota Corporation). A partir deste ponto, o procedimento é igual ao indicado para as amostras de EI.

No final de ambos os procedimentos, uma das três lâminas de microscopia com o esfregaço foi usada para efectuar o diagnóstico parasitológico pela técnica de IFI/AcM, e as restantes, conservadas a -20°C, para estudos posteriores ou, caso necessário, para confirmação de algum resultado. Os *eppendorfs*, contendo a amostra concentrada, foram armazenados a -80°C de modo a conservar, intacto, todo o material biológico.

## 10.5. Diagnóstico parasitológico

O diagnóstico definitivo da PPc consiste num exame histopatológico em secreções pulmonares. Este diagnóstico é feito com base na visualização de organismos de P.j. com recurso a técnicas de microscopia.

A técnica de referência aplicada no decorrer do presente trabalho, para o diagnóstico parasitológico foi a imunofluorescência indirecta com anticorpos monoclonais para detecção de quistos de *Pneumocystis* (IFI/AcM). Esta técnica consiste na identificação dos quistos de P.j. através da marcação dos antigénios de superfície com anticorpos monoclonais AcM específicos, produzidos a partir de ratos. Neste trabalho foi utilizado um kit comercial, o Monofluo™ Kit *P. jirovecii* (Bio-Rad Laboratoires, Lda.), cujo protocolo é o seguinte:

a) Digestão enzimática.

Aquando da primeira utilização foi necessário reconstituir a enzima com 250µL de ácido clorídrico (HCl) 0,001M. Seguidamente colocou-se 20µL de enzima diluída (na proporção 1:10, com tampão específico fornecido pelo fabricante) directamente sobre o esfregaço, espalhando-se cuidadosamente. Colocou-se em câmara húmida na estufa (Heraeus) durante 30 minutos. A incubação tem esta duração, indicada pelo fabricante, para que não ocorra sobredigestão ou subdigestão das paredes quísticas. Durante este passo, a tripsina vai actuar sobre a camada mais exposta da parede celular dos quistos de P.j. de forma a expor os antigénios de superfície, tornando-os assim, mais acessíveis aos anticorpos.

b) Reacção com o AcM.

Logo após a incubação, a lâmina foi cuidadosamente lavada com água desionizada. Após secagem, aplicou-se 20 µL da solução de AcM específico e voltou-se a incubar a 37°C em câmara húmida na estufa (Heraeus), durante 15 minutos.

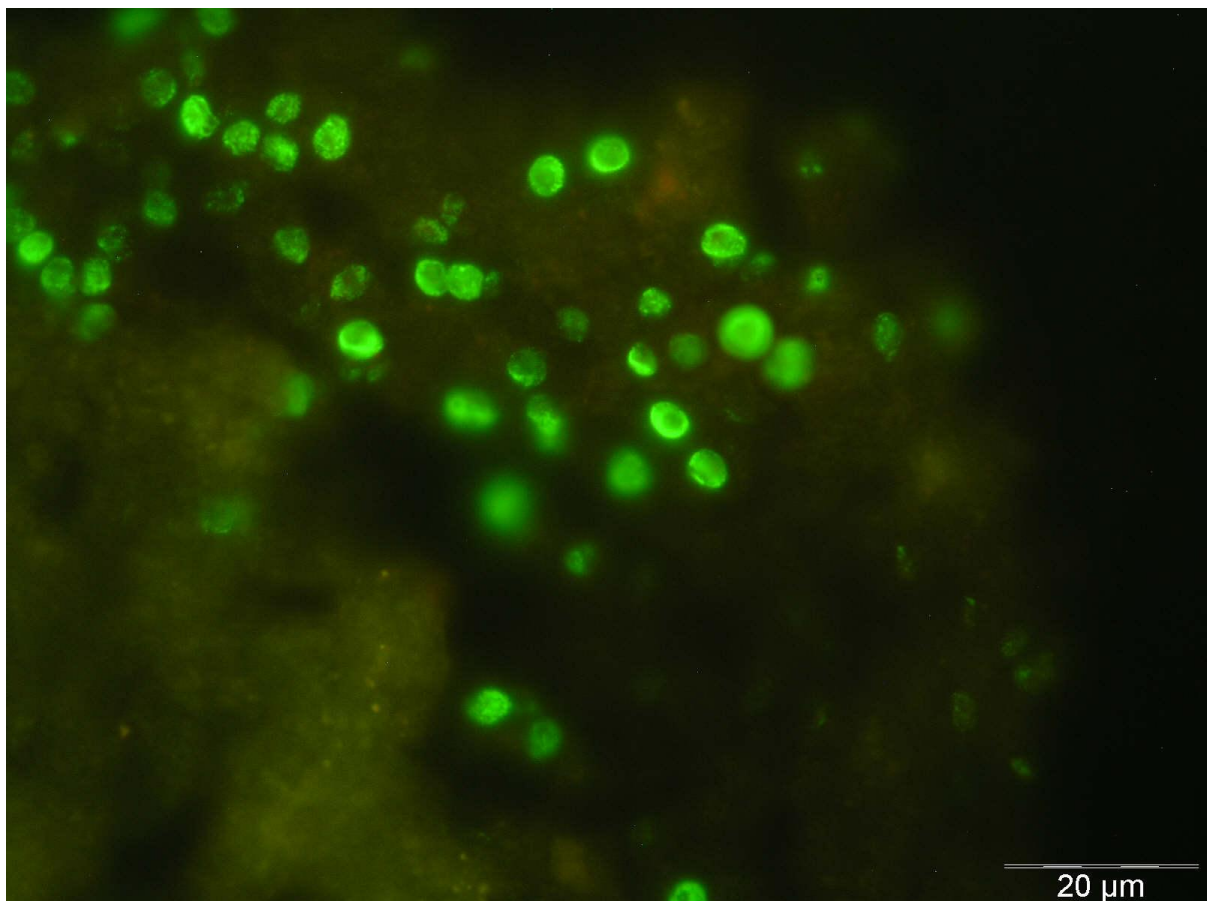
c) Reacção com o conjugado com fluoresceína.

Findo esse tempo, lavou-se a lâmina com água destilada e secou-se de imediato. Aplicou-se 20µL de solução de conjugado com isotiocianato de fluoresceína sobre o esfregaço e colocou-se a lâmina em câmara húmida na estufa (Heraeus), a 37°C, por 15 minutos. Este conjugado consiste num anti-anticorpo (IgM) conjugado com isotiocianato

de fluoresceína, o qual vai reagir, ligando-se ao anticorpo que já se encontra conectado aos antígenos de superfície da parede dos quistos de P.j.. A fluoresceína, quando exposta a uma luz de comprimento de onda de 475nm, emite fluorescência de cor verde limão característica.

d) Observação no microscópio de fluorescência.

Por fim, montou-se a preparação com o meio de montagem fornecido (glicerina tamponada), ficando pronta para ser observada ao microscópio óptico de fluorescência (Olympus U-RFL-T) no comprimento de onda de 475nm. Considerou-se um resultado positivo, a observação de dois ou mais quistos ovais ou arredondados com parede espessa, entre 4-5µm de diâmetro e cor verde limão intensa, aparecendo isolados ou agrupados (**figura 7**). Os testes que apresentaram apenas um quisto foram considerados inconclusivos, devendo ser repetidos para confirmação do diagnóstico [Matos *et al.* 2006].



**Figura 7.** Quistos de *P. jirovecii* corados por IFI/AcM (X 1000), numa amostra de LBA (Original do Autor).

Esta técnica também serviu para a quantificação da carga parasitária das amostras em estudo, estimada através da contagem do número de quistos observados nos esfregaços, como está descrito no **quadro I**.

**Quadro I.** Critérios utilizados para a determinação da carga parasitária dos isolados de P.j..

| Carga parasitária | Nº de quistos P.j. detectados por IFI/AcM (X1000) |
|-------------------|---------------------------------------------------|
| <b>Baixa*</b>     | Nenhum quisto identificado em 30 campos           |
| <b>Moderada</b>   | Um a 30 quistos detectados em 30 campos           |
| <b>Alta</b>       | Dois ou mais quistos detectados num campo         |

\* Amostras negativas por IFI/AcM, mas positivas para P.j. por detecção molecular (PCR *nested*).

## 10.6. Diagnóstico molecular

As amostras cujo diagnóstico parasitológico de PPc por IFI/AcM, foi negativo, foram submetidas ao diagnóstico molecular, pela técnica PCR *nested*, que consiste na amplificação de um fragmento específico, neste caso o *mtLSU rRNA*. Para tal, foi necessário efectuar a extracção de DNA genómico, cujo método utilizado é descrito em seguida.

### 10.6.1. Extracção de DNA genómico pelo método de mini Beadbeater/tiocianato de guanidina-sílica

O método de mini Beadbeater/tiocianato de guanidina-sílica utilizado para a extracção de DNA genómico, adaptado de outros autores [Boom *et al.*, 1990; McLauchli, *et al.*, 2000], divide-se em quatro fases:

#### 1) Lise celular

Num *eppendorf* de 2 mL com tampa de rosca introduziu-se: 0,3 g de partículas de zircónio com 0,5 mm de diâmetro (Biospec Products); 900 µL de tampão de lise [tiocianato de guanidina (7 M; Calbiochem); Tris-HCl (50mM, pH 6.4; Calbiochem-Sigma-Aldrich); EDTA (25mM, pH 8.0; Merck); Triton X-100 (1,5% v/v; Serva)]; 60 µL de álcool isoamílico (Merck), e por fim, a amostra biológica processada. Agitou-se à velocidade máxima (2800 oscilações/minuto), durante dois minutos, no aparelho Mini Beadbeater (Biospec Products). Neste passo, o tampão vai provocar a lise celular, sendo auxiliado pela acção mecânica, promovida pela movimentação das partículas de zircónio a alta velocidade. Seguidamente procedeu-se à centrifugação (modelo Kubota 3000; Kubota Corporation) a velocidade máxima (20200 *g*), durante 15 segundos, facilitando a acção do álcool isoamílico que, sendo um solvente orgânico, vai promover a sedimentação dos detritos insolúveis. Findo este tempo, transferiu-se cuidadosamente o sobrenadante para um novo *eppendorf* de 1,5 mL.

## **2) Adsorção de DNA**

Ao *eppendorf* contendo o sobrenadante, adicionou-se 40  $\mu\text{L}$  de uma suspensão aquosa de sílica em pó a 1% (pH 2.0; Sigma) que, estando carregada positivamente, apresenta afinidade de ligação para o DNA, ficando adsorvido nas partículas de sílica. De seguida, incubou-se à temperatura ambiente num agitador rotativo (Fröbel Labortechnik GmbH), a velocidade moderada, durante uma hora. Finda a incubação, centrifugou-se (modelo Kubota 3000; Kubota Corporation) à velocidade máxima (23100  $g$ ), durante 15 segundos para que a sílica sedimentasse juntamente com o DNA adsorvido. Desprezou-se o sobrenadante e procedeu-se ao próximo passo.

## **3) Lavagem**

Cada lavagem consiste na ressuspensão da sílica em 200  $\mu\text{L}$  de solução ou solvente e posterior centrifugação (modelo Kubota 3000; Kubota Corporation) à velocidade máxima (23100  $g$ ), durante 15 segundos. As primeiras duas lavagens foram realizadas com o tampão de lavagem [tiocianato de guanidina (7 M; Calbiochem); Tris-HCl (50mM, pH 6.4; Calbiochem-Sigma-Aldrich)], de forma a eliminar detritos e contaminantes adsorvidos na sílica. Na terceira lavagem, utilizou-se etanol a 80% (Panreac Química, S.A.) que vai eluir os contaminantes orgânicos, tal como acontece na última lavagem, com acetona absoluta (Panreac Química, S.A.). Por fim, desprezou-se a acetona e incubou-se o *eppendorf* a 70°C, no aparelho Block Heater (Stuart Scientific), até à evaporação completa do solvente.

## **4) Eluição do DNA**

Ressuspendeu-se a sílica com o DNA adsorvido em 60  $\mu\text{L}$  de água destilada estéril e incubou-se a 70°C no Block Heater (Stuart Scientific), durante 10 minutos, para facilitar a eluição do DNA. Centrifugou-se (modelo Kubota 3000; Kubota Corporation) à velocidade máxima (23100  $g$ ), durante 2 minutos, de modo a sedimentar a sílica e recolheu-se o sobrenadante com o DNA dissolvido para um novo *eppendorf* de 1,5 mL que foi armazenado a -20°C.

### 10.6.2. Amplificação do *mtLSU rRNA* pela PCR *nested*

A técnica de PCR é bastante utilizada no diagnóstico molecular de PPc devido à sua elevada sensibilidade, simplicidade e custo relativamente reduzido, permitindo a obtenção de um elevado número de cópias de uma sequência específica de DNA. Além do mais, esta técnica de amplificação de DNA é capaz de detectar DNA de P.j. em amostras menos sensíveis, obtidas por métodos minimamente invasivos, tais como esfregaços orais e expectorações, ou em casos com cargas parasitárias reduzidas [Ponce *et al.*, 2010].

No presente estudo, a detecção molecular de P.j. nas secreções pulmonares foi efectuada através da amplificação do gene *mtLSU rRNA*, com um fragmento de 263 pb. Esta análise foi realizada com dois pares de *primers* específicos complementares à região alvo. O primeiro par, pAZ 102-E – pAZ 102-H, é específico para a primeira etapa de amplificação; sendo o par pAZ-102-X – pAZ-102-Y, utilizado na segunda etapa de amplificação [Wakefield, 1996; Matos *et al.*, 2001]. As características destes *primers* encontram-se descritas no **quadro II**.

**Quadro II.** Características dos *primers* utilizados para o diagnóstico molecular por amplificação do gene *mtLSU rRNA* pela PCR *nested*.

| <i>Locus</i>      | <i>Primer</i> | Sequência (5' → 3')     | Tamanho (pb) | T <sub>m</sub> * (°C) | GC (%) | Produto (pb) |
|-------------------|---------------|-------------------------|--------------|-----------------------|--------|--------------|
| <i>mtLSU rRNA</i> | pAZ 102-E     | GATGGCTGTTTCCAAGCCCA    | 20           | 61.8                  | 55     | 346          |
|                   | pAZ 102-H     | GTGTACGTTGCAAAGTACTC    | 20           | 46.9                  | 45     |              |
|                   | pAZ 102-X     | GTGAAATACAAATCGGACTAGG  | 22           | 52.1                  | 41     | 263          |
|                   | pAZ 102-Y     | TCACTTAATATTAATTGGGGAGC | 23           | 53.3                  | 35     |              |

\*A temperatura de desnaturação (T<sub>m</sub>) foi calculada com o auxílio do programa *Primer Express 3.0*.

Por cada amostra preparou-se uma mistura de reacção composta por: tampão de reacção 1X [160 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 670 mM Tris-HCl (pH 8.8); 0,01% Tween-20; Bioline]; 0,2 µM de cada *primer* (pAZ 102-E e pAZ 102-H, na primeira parte; pAZ 102-X e pAZ 102-Y, na segunda parte; MWG Biotech); 0,2 mM de uma mistura de desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs; Applied Biosystems); 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Bioline); 0,01 µg/µL de albumina sérica bovina (BSA; Sigma); 0,75 U de BioTaq™ DNA polimerase (Bioline); 2 µL de DNA genómico resultante do método descrito no ponto “ 9.5.1. Extracção de DNA genómico pelo

método de mini Beadbeater/tiocianato de guanidina-sílica”; e, por fim, perfaz-se o volume final (25 µL) com água desionizada estéril. A mistura de reacção utilizada na segunda parte do PCR *nested* apenas difere no par de *primers* e a utilização de 2 µL de produto de PCR da primeira etapa de reacção, como molde de DNA.

A monitorização do procedimento foi feita utilizando dois controlos: um positivo (com suspensão de DNA genómico de P.j.), e um negativo (com água desionizada estéril em substituição do DNA molde), utilizados em ambas etapas da reacção.

As condições de amplificação para ambas etapas, processadas no termociclador (modelo: *T1 Thermocycler*, Biometra®), encontram-se descritas no **quadro III**.

**Quadro III.** Condições utilizadas, em ambas as etapas da PCR *nested*, para amplificação do gene *mtLSU rRNA* de *Pneumocystis jirovecii*.

| Etapas                      | Programa PCR  |           |
|-----------------------------|---------------|-----------|
| <b>Desnaturação inicial</b> | 94°C – 3 min  |           |
| <b>Desnaturação</b>         | 94°C – 1 min  | 39 Ciclos |
| <b>Ligação</b>              | 55°C – 1 min  |           |
| <b>Extensão</b>             | 72°C – 1min   |           |
| <b>Extensão Final</b>       | 72°C – 10 min |           |

Para posterior visualização dos produtos de amplificação, as amostras foram preparadas da seguinte forma: a 10 µL do produto final da PCR *nested*, adicionou-se 2 µL de tampão de aplicação (Fermentas); em paralelo, a 1 µL de marcador de peso molecular 100 pb (Gene Ruler™; Fermentas) juntou-se 1 µL de tampão de aplicação e 9 µL de água desionizada estéril.

O DNA amplificado foi, então, submetido a uma electroforese em gel de agarose a 1% (Merck), em tampão TAE 1X (40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA, pH 8.3; Sigma), adicionando como corante 0,5 µg/mL de brometo de etídio (Sigma). Aplicaram-se as amostras nos respectivos poços, e a separação electroforética foi efectuada a 100 V, durante aproximadamente uma hora. Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados com o auxílio de um transiluminador de luz ultravioleta (Vilber Lourmat), auxiliada pelas moléculas

de brometo de etídio que possuem propriedades intercalantes e apresentam fluorescência quando emitida radiação UV.

O resultado foi considerado positivo na existência de uma banda com cerca de 263 pb, relativo ao gene *mtLSU rRNA*.

### **10.7. Quantificação dos níveis serológicos de KL-6**

Como já foi referido, para a quantificação dos níveis serológicos de KL-6 foi utilizado um kit comercial, Eitest KL-6 ELISA kit, cujos reagentes foram preparados segundo as instruções do fabricante (EIDIA Co., Ltd., Japão).

Inicialmente, diluiu-se a amostra com o tampão fornecido no kit (tris-BSA), numa proporção de 1:201. Colocou-se 100 µL de solução de reacção em cada poço da microplaca, seguida por 20 µL de amostra. Em paralelo, introduziram-se 20 µL de cada padrão de KL-6 no respectivo poço. Incubou-se ao abrigo da luz e à temperatura ambiente por 2 horas. Findo esse tempo, descartou-se o conteúdo da microplaca e procedeu-se a três lavagens com a solução de lavagem. Após remoção completa da solução de lavagem, adicionou-se 100 µL de conjugado (anti-AcM-HRP) em cada poço e incubou-se nas mesmas condições durante 1 hora. Procedeu-se novamente ao passo de lavagem e, seguidamente adicionou-se 100 µL de solução do substrato enzimático (solução de peróxido de hidrogénio a 3% com cromogénio ABTS) e deixou-se incubar por trinta minutos. Por fim, adicionou-se 100 µL de solução de azida de sódio, para terminar a reacção enzimática e efectuou-se a leitura das absorvâncias num leitor de microplacas (Infinite® 200 PRO NanoQuant, Tecan) num comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 405 nm, tendo como referência  $\lambda = 492$  nm.

Para determinar as concentrações de KL-6 em cada amostra, efectuou-se uma curva padrão das soluções padrão de KL-6, subtraindo o valor do branco (0 U/mL). O valor mínimo e máximo de detecção de KL-6 deste kit é, respectivamente, 201 e 4020 U/mL.

## 10.8. Quantificação dos níveis serológicos de SAM

Para a quantificação dos níveis serológicos de SAM foi utilizado um kit comercial, General S-Adenosyl Methionine, SAM ELISA kit, cujos reagentes e soluções padrão foram preparados segundo as instruções do fabricante (EIAab®, China).

Colocou-se 50 µL de amostra ou solução padrão, a cada poço, adicionando de seguida, 50 µL do conjugado SAM-biotina. Neste passo, a SAM presente na amostra, vai competir com o conjugado SAM-biotina. Cobriu-se a microplaca e incubou-se a 37°C durante 1 hora. Findo este tempo, procede-se à lavagem dos poços utilizando o tampão de lavagem fornecido. Após completa remoção de qualquer resíduo de tampão, adiciona-se 100 µL do conjugado avidina-HRP, selou-se e incubou-se nas mesmas condições durante 45 minutos. Repetiu-se o processo de lavagem e adicionou-se 90 µL de solução de substrato enzimático (TMB) prosseguindo-se uma incubação entre 15 a 30 minutos, a 37°C e ao abrigo da luz. Por fim, adicionou-se 50 µL de solução de ácido sulfúrico que vai parar a reacção enzimática, havendo alteração da cor. A concentração de SAM nas amostras é determinada, comparando a densidade óptica, num comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 450 nm, com a curva padrão.

## 10.9. Análise estatística

Considerando o número e natureza das variáveis e o tipo de resposta pretendida, utilizou-se inicialmente o teste do Chi-Quadrado ( $\chi^2$ ). Assim sendo, procuraram-se possíveis associações entre variáveis qualitativas, recorrendo-se ao programa informático SPSS (do inglês, *Statistical Package for Social Sciences*), versão 20.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). Os dados foram agrupados em tabelas de dupla entrada e a análise foi efectuada com um intervalo de confiança de 95%, de onde resultaram associações, estatisticamente significativas, quando o valor de  $P$  foi inferior ou igual a 0,05. A comparação da distribuição das variáveis entre os grupos foi realizada através do teste de Mann-Whitney U e do teste de Kruskal-Wallis. A curva ROC (do inglês, *Receiver Operating Characteristic*), sensibilidade, especificidade, e valores preditivos negativos e positivos foram calculados com um nível de significância de 5%, de forma a avaliar a confiança dos biomarcadores em estudo para o diagnóstico da PPC, com o auxílio do software R (<http://www.r-project.org/>).

## 11. Resultados

### 11.1. KL-6

#### 11.1.1. Casos clínicos em estudo

No decorrer do presente trabalho foram analisadas 145 amostras, incluindo 92 (63%) casos de PPc (87 confirmados e 5 com apresentação clínica atípica), e 53 (37%) amostras referentes a doentes com outra patologia pulmonar que não PPc (23 colonizados por P.j. apresentando infecção subclínica e 30 doentes não infectados por P.j.). Como grupo de controlo para a quantificação de KL-6 utilizaram-se 37 amostras de dadores saudáveis. Todo o trabalho foi efectuado no âmbito de dois Projectos de Investigação, previamente submetidos e aprovados pelos conselhos de ética das instituições envolvidas. Os doentes participaram de forma voluntária e após assinatura do consentimento informado. Toda a documentação foi devidamente processada e mantida em confidencialidade.

Com base na informação clínica obtida (**quadro IV**), e nos resultados do diagnóstico laboratorial (**quadro V**), definiram-se os critérios de classificação dos casos clínicos, que se dividiram nos seguintes grupos:

- 1) Grupo A, doentes com PPc confirmada laboratorialmente (identificação parasitológica e detecção molecular positivas) e com quadro clínico compatível (casos confirmados de PPc);
- 2) Grupo B, doentes com PPc confirmada laboratorialmente (identificação parasitológica e detecção molecular positivas), mas sem quadro clínico compatível (casos com apresentação clínica atípica de PPc);
- 3) Grupo C, doentes com infecção assintomática por P.j., sem quadro clínico sugestivo de PPc, identificação parasitológica negativa, mas detecção molecular positiva (casos de colonização subclínica);
- 4) Grupo D, doentes não portadores de P.j., com outras patologias pulmonares (detecção molecular negativa para P.j.);
- 5) Grupo E, grupo de controlo correspondente aos dadores de sangue.

É de referir que para o Grupo E (dadores de sangue), apenas foi recolhida amostra de sangue.

**Quadro IV.** Características clínicas dos doentes em estudo para o KL-6.

|                                                                 | Casos PPc positivos  |                    | Casos PPc negativos  |                     |
|-----------------------------------------------------------------|----------------------|--------------------|----------------------|---------------------|
|                                                                 | Grupo A<br>(n = 87)  | Grupo B<br>(n = 5) | Grupo C<br>(n = 23)  | Grupo D<br>(n = 30) |
| Sexo masculino/feminino                                         | 56/31                | 1/4                | 17/6                 | 24/6                |
| Média de idades (mediana), anos                                 | 38 (38)              | 37 (40)            | 36 (36)              | 37 (39)             |
| <b>Diagnóstico clínico<sup>a</sup>, n (%)</b>                   |                      |                    |                      |                     |
| Compatível                                                      | 87 (100)             | -                  | 0                    | 11 (37)             |
| Não compatível                                                  | -                    | 5 (100)            | 23 (100)             | 19 (63)             |
| <b>Condições associadas ao estado de imunossupressão, n (%)</b> |                      |                    |                      |                     |
| VIH                                                             | 81 <sup>b</sup> (93) | 5 (100)            | 19 <sup>c</sup> (83) | 26 (87)             |
| Tumor                                                           | 2 (2)                | 0                  | 1 <sup>c</sup> (4)   | 0                   |
| Transplante                                                     | 4 <sup>b</sup> (5)   | 0                  | 1 (4)                | 3 (10)              |
| Outra                                                           | 2 (2)                | 0                  | 3 (13)               | 1 (3)               |
| <b>PaO<sub>2</sub>, n (%)</b>                                   |                      |                    |                      |                     |
| ≤ 65 mmHg                                                       | 52 (60)              | 0                  | 0                    | 4 (13)              |
| > 65 mmHg                                                       | 24 (28)              | 5 (100)            | 14 (61)              | 17 (57)             |
| Sem informação                                                  | 11 (13)              | 0                  | 9 (39)               | 9 (30)              |
| <b>Radiograma do tórax, n (%)</b>                               |                      |                    |                      |                     |
| Compatível com PPc                                              | 79 (91)              | 2 (40)             | 9 (39)               | 19 (63)             |
| Não compatível                                                  | 6 (7)                | 3 (60)             | 13 (57)              | 8 (27)              |
| Sem informação                                                  | 2 (2)                | 0                  | 1 (4)                | 3 (10)              |
| <b>Contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, n (%)</b>          |                      |                    |                      |                     |
| > 200 células/mm <sup>3</sup>                                   | 1 (1)                | 2 (40)             | 9 (39)               | 6 (20)              |
| 51-200 células/mm <sup>3</sup>                                  | 33 (38)              | 2 (40)             | 4 (17)               | 6 (20)              |
| ≤ 50 células/mm <sup>3</sup>                                    | 30 (34)              | 0                  | 3 (13)               | 7 (23)              |
| Sem informação                                                  | 23 (26)              | 1 (20)             | 7 (31)               | 11 (37)             |
| <b>Evolução clínica, n (%)</b>                                  |                      |                    |                      |                     |
| Positiva                                                        | 23 (26)              | 2 (40)             | 3 (13)               | 3 (10)              |
| Negativa                                                        | 9 (10)               | 1 (20)             | 2 (9)                | 1 (3)               |
| Sem informação                                                  | 55 (63)              | 2 (40)             | 18 (78)              | 26 (87)             |

a) Febre, dispneia, tosse não produtiva; b) Dois doentes apresentam mais que uma condição imunossupressora (VIH e transplante); c) Um doente apresenta mais que uma condição imunossupressora (VIH e tumor).

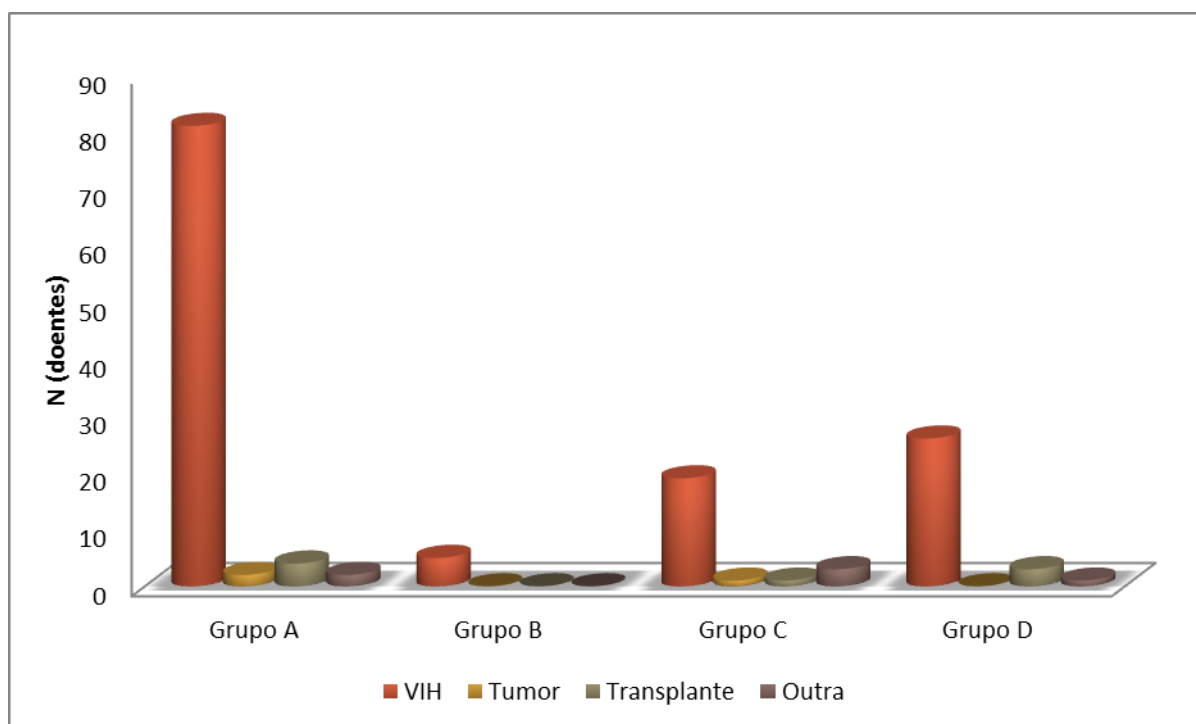
A pressão parcial do oxigénio (PaO<sub>2</sub>) no sangue periférico, inferior a 65 mmHg, demonstrou estar significativamente associada aos doentes com PPc ( $P < 0,001$ ), assim como contagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup> entre 51 e 200 células/mm<sup>3</sup>, quando comparada com os doentes com outras patologias pulmonares ( $P = 0,027$ ), utilizando o teste de Mann-Whitney.

**Quadro V.** Resultados do diagnóstico laboratorial.

|                                                     | Casos PPc positivos |                    | Casos PPc negativos |                     |
|-----------------------------------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
|                                                     | Grupo A<br>(n = 87) | Grupo B<br>(n = 5) | Grupo C<br>(n = 23) | Grupo D<br>(n = 30) |
| <b>Carga parasitária<sup>a</sup>, n (%)</b>         |                     |                    |                     |                     |
| Baixa                                               | 32 (37)             | 0                  | 23 (100,0)          | -                   |
| Moderada                                            | 46 (53)             | 4 (80)             | -                   | -                   |
| Alta                                                | 9 (10)              | 1 (10)             | -                   | -                   |
| <b>Deteção molecular de P.j.<sup>b</sup>, n (%)</b> |                     |                    |                     |                     |
| Positiva                                            | 87 (100)            | 5 (100)            | 23 (100)            | -                   |
| Negativa                                            | -                   | -                  | -                   | 30 (100)            |

a) IFI/AcM; b) PCR

As doenças subjacentes mais comuns dos doentes com PPc incluem doenças hematológicas, tumorais e a infecção pelo VIH. A PPc foi diagnosticada através de métodos parasitológicos (IFI/AcM) e moleculares (PCR *nested*) em 86 (66%) dos 131 doentes seropositivos para VIH (dois dos quais, doentes transplantados) e em seis (43%) de 14 doentes seronegativos para VIH (dois doentes sujeitos a transplante, dois com doença tumoral e duas crianças com 9 e 18 meses, respectivamente). Vinte e três doentes (19 seropositivos para VIH, um dos quais com doença tumoral; um doente transplantado, duas crianças com idade inferior a sete anos e um doente com causa imunossupressora desconhecida), cuja análise parasitológica foi negativa, embora com deteção molecular de P.j. positiva, foram classificados como casos de colonização subclínica ou infecção assintomática por P.j. (**figura 8**).



**Figura 8.** Distribuição dos casos clínicos em função das condições associadas ao estado de imunossupressão.

Quanto à caracterização demográfica das amostras, estas provinham de doentes com idades compreendidas entre os 9 meses e os 68 anos, de ambos os sexos, sendo 47 do sexo feminino (32%) e 98 do sexo masculino (68%). No **quadro VI**, estão representadas as faixas etárias dos doentes, em função do diagnóstico, verificando-se uma maior percentagem de casos de PPc em indivíduos com idades a partir dos 30 anos.

**Quadro VI.** Distribuição dos casos clínicos consoante o grupo etário.

| Grupo Etário<br>(anos) | Casos PPc positivos |                  | Casos PPc negativos |                  |
|------------------------|---------------------|------------------|---------------------|------------------|
|                        | Grupo A<br>N (%)    | Grupo B<br>N (%) | Grupo C<br>N (%)    | Grupo D<br>N (%) |
| 0 - 4                  | 4 (5)               | 0                | 0                   | 1 (3)            |
| 5 - 9                  | 0                   | 0                | 2 (9)               | 0                |
| 10 - 19                | 2 (2)               | 0                | 0                   | 0                |
| 20 - 29                | 13 (15)             | 2 (40)           | 1 (4)               | 7 (23)           |
| 30 - 39                | 29 (33)             | 0                | 13 (57)             | 9 (30)           |
| ≥ 40                   | 39 (45)             | 3 (60)           | 7 (30)              | 13 (44)          |
| <b>Total</b>           | <b>87 (100)</b>     | <b>5 (100)</b>   | <b>23 (100)</b>     | <b>30 (100)</b>  |

### 11.1.2. Análise dos níveis serológicos de KL-6

Os níveis serológicos de KL-6 foram determinados em 145 amostras de soro de forma a avaliar o seu potencial como indicador auxiliar no diagnóstico da PPc. Como se verifica no **quadro VII**, o grupo dos doentes com PPc apresenta a mediana dos níveis de KL-6 mais elevada (969 U/mL), distinguindo-se dos doentes negativos para PPc (437 U/mL) e dos dadores de sangue (230 U/mL).

**Quadro VII.** Medianas dos níveis de KL-6 (U/mL).

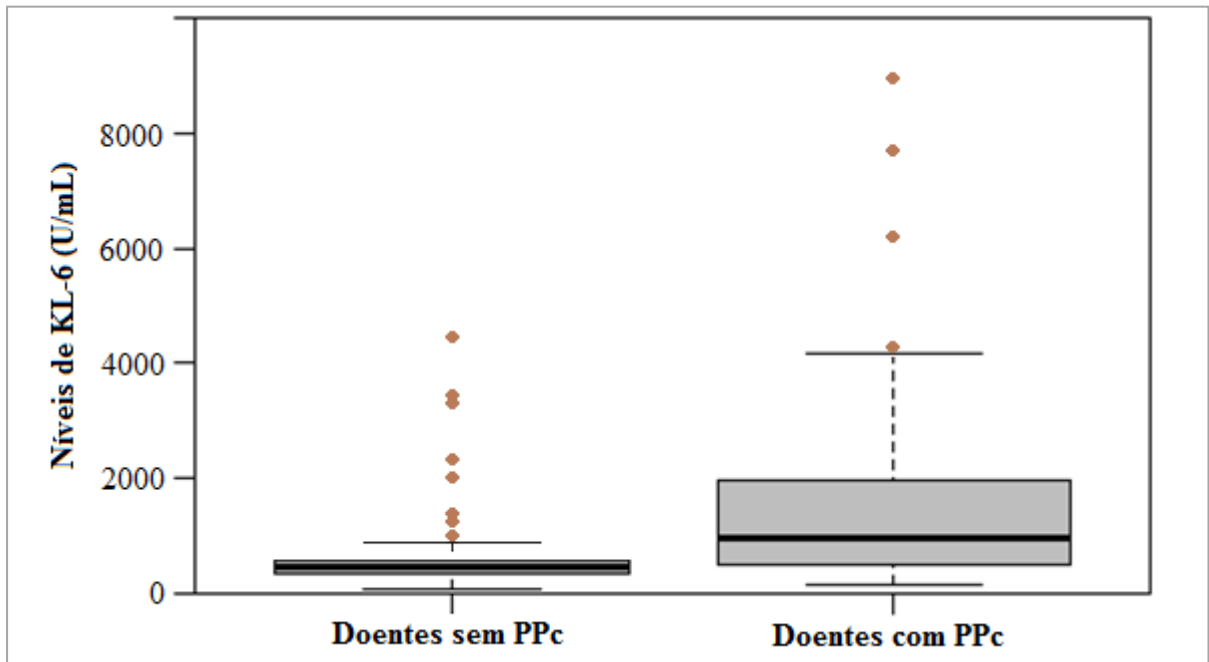
|                        | N (%)   | KL-6 (U/mL) |
|------------------------|---------|-------------|
| <b>Doentes com PPc</b> | 92 (63) | 969         |
| <b>Doentes sem PPc</b> | 53 (37) | 437         |
| <b>Dadores</b>         | 30      | 230         |

Os doentes com PPc, subdivididos nos casos confirmados (**grupo A**) e casos com apresentação clínica atípica de PPc (**grupo B**), apresentam medianas de 991 U/mL e 415 U/mL. No que diz respeito aos doentes sem PPc, subdivididos nos casos de colonização subclínica (**grupo C**) e doentes com outras patologias pulmonares (**grupo D**), as medianas são de 409 U/mL e 442 U/mL, respectivamente (**quadro VIII**).

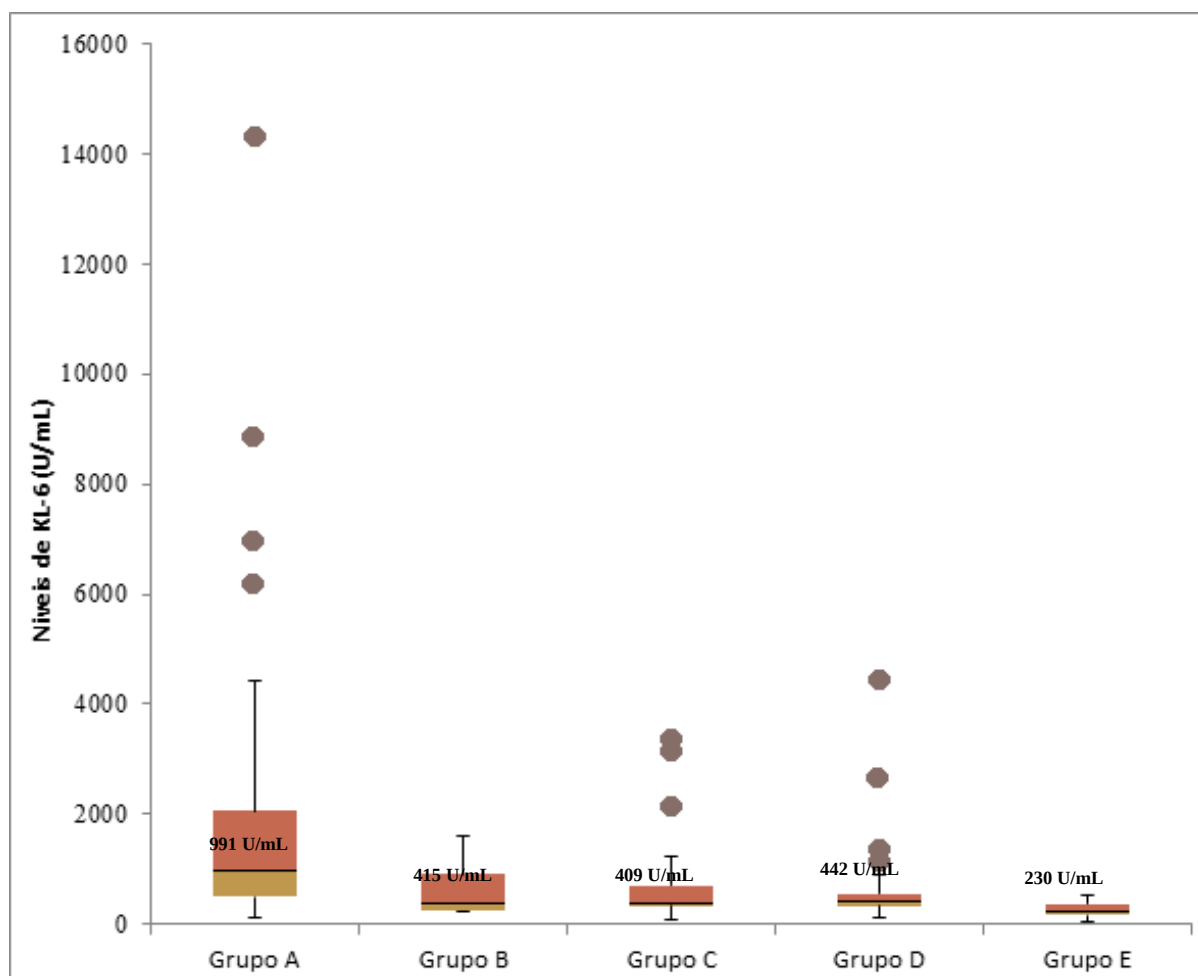
**Quadro VIII.** Medianas dos níveis de KL-6 (U/mL) nos diferentes grupos de amostras estudadas.

|                | N (%)   | KL-6 (U/mL) |
|----------------|---------|-------------|
| <b>Grupo A</b> | 87 (60) | 991         |
| <b>Grupo B</b> | 5 (3)   | 415         |
| <b>Grupo C</b> | 23 (16) | 409         |
| <b>Grupo D</b> | 30 (21) | 442         |

Na **figura 9 e 10**, é possível verificar a distribuição dos níveis de KL-6 consoante os grupos clínicos em estudo. Os níveis serológicos de KL-6 foram significativamente superiores ( $P < 0,001$ ) nos doentes com PPc (grupo A e B) quando comparados com os demais (grupo C e D).



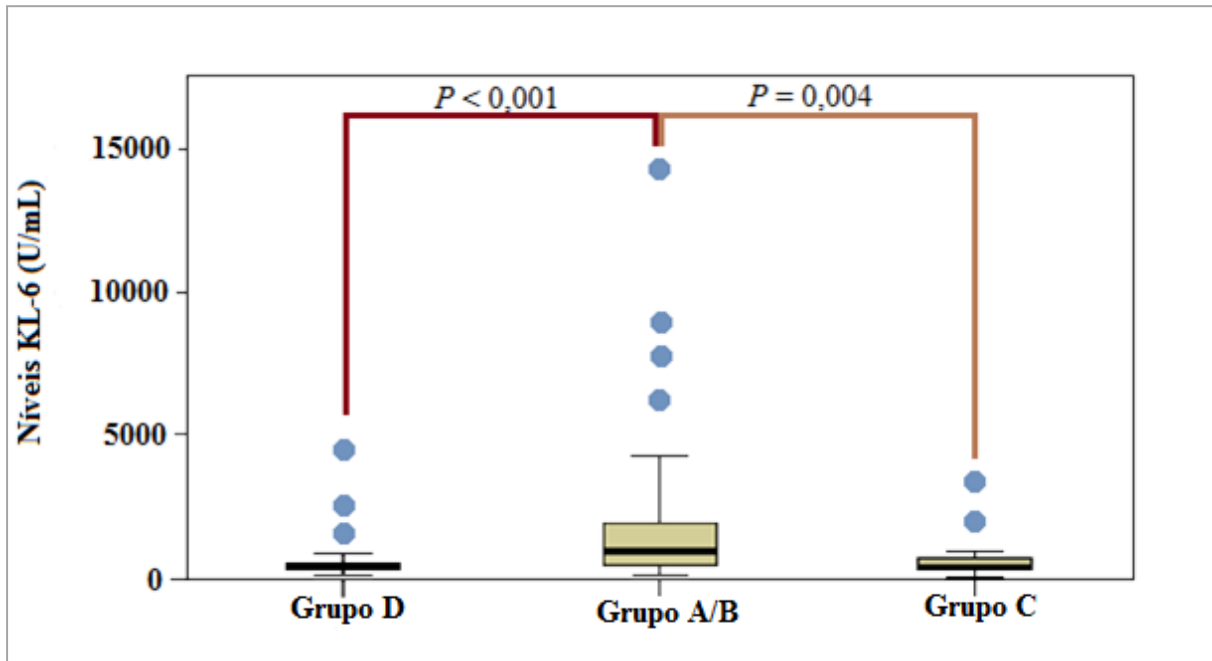
**Figura 9.** Representação gráfica da distribuição dos níveis de KL-6 nos casos de PPc e nos doentes sem PPc, em que cada *box-and-whisker plot* apresenta o segundo e terceiro quartil ( $Q_{2/4}$  e  $Q_{3/4}$ ), a mediana, e o primeiro e quarto quartil ( $Q_{1/4}$  e  $Q_{4/4}$ ). Os pontos castanhos representam os valores extremos. Os níveis serológicos de KL-6 foram significativamente superiores nos doentes com PPc ( $P < 0,001$ ), em que o teste de Mann-Whitney rejeitou a hipótese nula da distribuição de KL-6 ser a mesma entre diferentes grupos nos níveis de significância habituais ( $\alpha = 1\%$ ,  $5\%$  e  $10\%$ ).



**Figura 10.** Representação gráfica da distribuição dos níveis de KL-6 nos diferentes grupos clínicos, em que cada *box-and-whisker plot* apresenta o segundo e terceiro quartil ( $Q_{2/4}$  e  $Q_{3/4}$ ), a mediana, e o primeiro e quarto quartil ( $Q_{1/4}$  e  $Q_{4/4}$ ). Os pontos castanhos representam os valores extremos.

### **Casos de PPc e casos com infecção assintomática por P.j.**

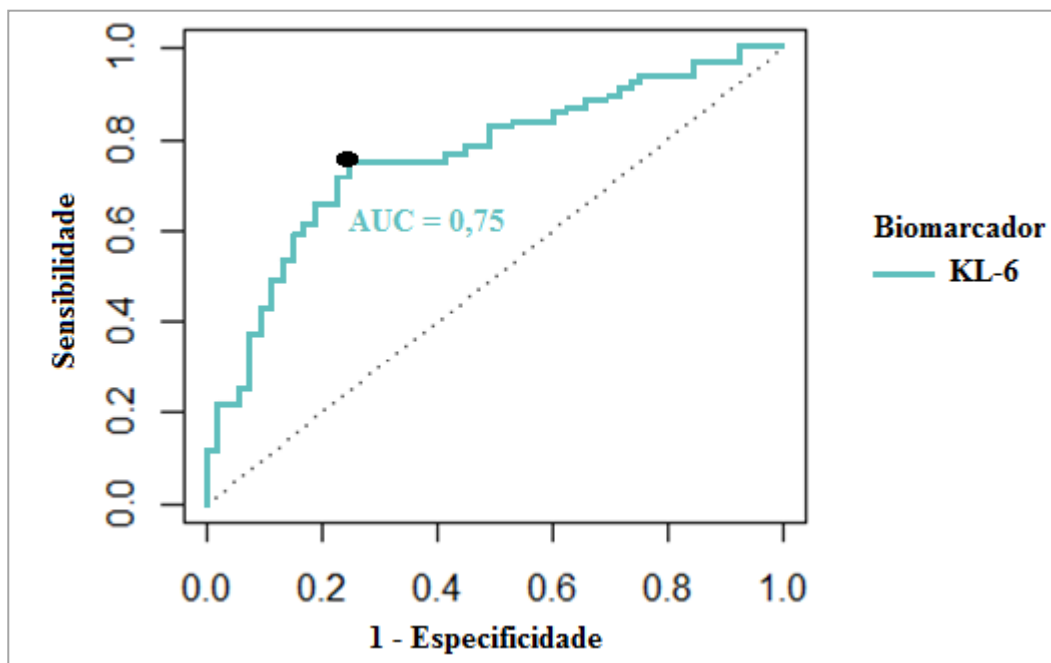
Outra vertente em estudo é a relação entre os níveis de KL-6 dos casos PPc (grupos A e B) e os casos com infecção assintomática por P.j. (grupo C), comparando com os doentes sem PPc (grupo D). Para tal, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis que rejeitou a hipótese nula de que exista igualdade entre os valores medianos de KL-6. A rejeição da hipótese nula é devida às diferenças significativas entre os valores medianos de KL-6 dos grupos D e grupo A/B ( $P < 0.001$ ) e entre o grupo A/B e o grupo C ( $P = 0,004$ ). Os valores mais elevados apresentam-se no grupo dos casos confirmados de PPc, seguidos pelos casos com infecção assintomática por P.j. e, finalmente, os doentes sem PPc (**Figura 11**).



**Figura 11.** Representação gráfica da distribuição dos níveis de KL-6 dos casos PPc (grupo A/B), assintomáticos (grupo C) e casos PPc negativos (grupo D), em que cada *box-and-whisker plot* apresenta o segundo e terceiro quartil ( $Q_{2/4}$  e  $Q_{3/4}$ ), a mediana; e o primeiro e quarto quartil ( $Q_{1/4}$  e  $Q_{4/4}$ ). Os pontos azuis representam os valores extremos. O teste de Kruskal-Wallis rejeitou a hipótese nula de que a variação dos valores medianos de KL-6 entre os grupos é igual ( $P < 0,001$ ).

### Curva de ROC

A curva de ROC é uma representação gráfica da variação dos valores de sensibilidade e especificidade dos diferentes valores de *cut-off* analisados. Para o KL-6, verificou-se que a área abaixo da curva de ROC (AUC), associada ao poder discriminante do teste diagnóstico, foi determinada pela relação estatística Wilcoxon-Mann-Whitney, sendo de 75%, com um nível de significância de 95% (**figura 12**).



**Figura 12.** Representação gráfica da curva de ROC para o KL-6. O ponto corresponde ao valor de *cut-off* mais promissor estudado para o teste de KL-6 (590 U/mL). A área abaixo da curva (AUC) foi de 75% para um intervalo de confiança de 95%.

Os níveis serológicos de KL-6 superiores a 590 U/mL, foram estatisticamente associados aos casos diagnosticados com PPc (76%,  $P < 0,001$ ). No **quadro IX** encontram-se os diferentes valores de *cut-off* estudados para este marcador.

**Quadro IX.** Níveis serológicos de KL-6 (U/mL), como diagnóstico de PPc. Análise de diferentes valores de *cut-off*.

| KL-6<br>(U/mL) | Especificidade | Sensibilidade | VPN         | VPP         | P <sup>1</sup>    |
|----------------|----------------|---------------|-------------|-------------|-------------------|
| 300            | 20,8           | 92,4          | 61,1        | 66,9        | 0,021             |
| 400            | 41,5           | 82,6          | 57,9        | 71          | 0,001             |
| 500            | 58,5           | 71,7          | 54,4        | 75          | < 0,001           |
| 520            | 60,4           | 71,7          | 55,2        | 75,9        | < 0,001           |
| 540            | 60,4           | 71,7          | 55,2        | 75,9        | < 0,001           |
| 560            | 69,8           | 71,7          | 58,7        | 80,5        | < 0,001           |
| 580            | 73,6           | 71,7          | 60          | 82,5        | < 0,001           |
| <b>590</b>     | <b>75,5</b>    | <b>70,7</b>   | <b>59,7</b> | <b>83,3</b> | <b>&lt; 0,001</b> |
| 600            | 75,5           | 68,5          | 58          | 82,9        | < 0,001           |
| 700            | 77,4           | 60,9          | 53,2        | 82,4        | < 0,001           |
| 800            | 83             | 54,3          | 51,2        | 84,7        | < 0,001           |
| 900            | 84,9           | 53,3          | 51,1        | 86          | < 0,001           |
| 1000           | 86,8           | 47,8          | 48,9        | 86,3        | < 0,001           |
| 1100           | 86,8           | 46,7          | 48,4        | 86          | < 0,001           |
| 1200           | 86,8           | 44,6          | 47,4        | 85,4        | < 0,001           |

Especificidade – % de doentes sem PPc, correctamente identificados pelo teste como PPc negativos; Sensibilidade – % de doentes com PPc, correctamente diagnosticados pelo teste; VPN – valor preditivo negativo, refere-se à percentagem de doentes negativos pelo teste que, efectivamente, não têm PPc; VPP – valor preditivo positivo, refere-se à percentagem de doentes positivos pelo teste que, efectivamente, têm PPc; <sup>1</sup> Calculado pelo teste do Chi-quadrado ( $\chi^2$ ).

A sensibilidade e especificidade estão dependentes do valor de *cut-off* acima do qual este teste é positivo. No valor de *cut-off* equivalente a 590 U/mL, este biomarcador resultou numa especificidade de **76%** e sensibilidade de **71%**.

De seguida, procedeu-se à análise da variação dos níveis de KL-6 nos diferentes grupos em estudo, consoante as características clínicas, de forma a avaliar a sua capacidade como auxiliar no diagnóstico da PPc.

### **Condições associadas ao estado de imunossupressão**

Como se verifica no **quadro X**, os níveis de KL-6 foram significativamente superiores nos doentes com PPc, independentemente do tipo de doença imunológica ( $P > 0,001$ ).

Dos doentes PPc negativos, mas portadores assintomáticos de P.j. (grupo C), duas crianças de sete anos de idade e doença imunológica de etiologia desconhecida, e um indivíduo seropositivo para VIH, com contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> inferiores a 200 células/mm<sup>3</sup>, apresentaram valores de KL-6 superiores a 1000 U/mL. No que diz respeito ao grupo D, a mediana dos doentes transplantados apresenta-se elevada, sendo um dos doentes, uma criança de quatro anos de idade cujo nível de KL-6 superou os 4000 U/mL.

**Quadro X.** Medianas dos níveis de KL-6 (U/mL) nos diferentes grupos de amostras estudadas, em função das condições associadas à imunossupressão.

|                    | Níveis de KL-6 (U/mL) |         |         |         |
|--------------------|-----------------------|---------|---------|---------|
|                    | Grupo A               | Grupo B | Grupo C | Grupo D |
| <b>VIH</b>         | 1052                  | 415     | 472     | 440     |
| <b>Tumor</b>       | 3442                  | -       | 396     | -       |
| <b>Transplante</b> | 1079                  | -       | 311     | 565     |
| <b>Outra</b>       | 383                   | -       | 1995    | 271     |

### **Carga parasitária**

O teste de Kruskal-Wallis rejeitou a hipótese nula de que existe igualdade da distribuição dos valores de KL-6 entre os grupos de doentes com diferentes níveis de carga parasitária. Este resultado é devido à existência de diferenças significativas dos valores medianos de KL-6 entre: a) doentes não infectados por P.j. e os doentes com carga parasitária moderada ( $P = 0,003$ ); b) doentes não infectados por P.j. e doentes com carga parasitária alta ( $P < 0,001$ ); c) doentes com carga parasitária baixa e doentes com carga parasitária alta ( $P = 0,006$ ). Os valores mais elevados apresentam-se nos casos de carga parasitária alta, seguidos pelos doentes com carga parasitária moderada, baixa e, por fim, pelos doentes sem infecção por P.j. (**quadro XI**).

No que diz respeito aos doentes com carga parasitária moderada, os níveis medianos de KL-6 nos casos de PPc atípica (grupo B) foram bastante inferiores aos níveis detectados para os casos com PPc confirmada (grupo A), sendo, respectivamente, 326 e 1153 U/mL. É de salientar a diferença, embora que não acentuada, dos valores medianos de KL-6 para a carga parasitária baixa, entre o grupo A (720 U/mL) e C (542 U/mL).

**Quadro XI.** Medianas dos níveis de KL-6 (U/mL) nos diferentes grupos de amostras, em função da carga parasitária.

| Carga parasitária | Níveis de KL-6 (U/mL) |         |         |         |
|-------------------|-----------------------|---------|---------|---------|
|                   | Grupo A               | Grupo B | Grupo C | Grupo D |
| Baixa             | 720                   | -       | 542     | -       |
| Moderada          | 1153                  | 326     | -       | -       |
| Alta              | 1912                  | 1602    | -       | -       |

### Parâmetros clínicos

No **quadro XII** observa-se que os níveis de KL-6 são mais elevados em todos os parâmetros compatíveis com o diagnóstico da PPc, nomeadamente nos casos com PaO<sub>2</sub> inferior a 65 mmHg ( $P = 0,001$ ).

Embora a consistência de valores se aplique aos casos do grupo A, os valores medianos do grupo B e C apresentam uma ligeira variação entre os diversos parâmetros. No caso dos doentes com apresentação atípica de PPc (grupo B), os valores medianos de KL-6 foram inferiores, quando comparados com os casos confirmados de PPc (grupo A), nomeadamente no que diz respeito às situações em que o diagnóstico clínico não era compatível com PPc (415 U/mL); a PaO<sub>2</sub> era superior a 65mmHg (415 U/mL) ou nos casos em que o radiograma era, de facto, compatível com esta doença (326 U/mL). Já no que diz respeito aos doentes com infecção assintomática de P.j. (grupo C), quando comparados com os valores obtidos para o grupo A, existe uma diminuição nos níveis de KL-6 referentes aos doentes com PaO<sub>2</sub> superior a 65mmHg (542 U/mL); radiograma não compatível com PPc (570 U/mL); contagens de linfócitos entre 51 e 200 células/mm<sup>3</sup> (858 U/mL) e 50

células/mm<sup>3</sup> (570 U/mL); doentes com evolução clínica positiva (737 U/mL) ou negativa (1789 U/mL); em que este último valor corresponde a um caso apenas.

**Quadro XII.** Medianas dos níveis de KL-6 (U/mL) em função das diferentes características clínicas.

| Níveis KL-6 (U/mL)                              | Grupo A | Grupo B | Grupo C | Grupo D |
|-------------------------------------------------|---------|---------|---------|---------|
| <b>Diagnóstico clínico</b>                      |         |         |         |         |
| Compatível                                      | 991     | -       | -       | 478     |
| Não compatível                                  | -       | 415     | 409     | 406     |
| <b>PaO2</b>                                     |         |         |         |         |
| ≤ 65 mmHg                                       | 1327    | -       | -       | 464     |
| > 65 mmHg                                       | 954     | 415     | 542     | 444     |
| Sem informação                                  | 494     | -       | 331     | 436     |
| <b>Radiograma do tórax</b>                      |         |         |         |         |
| Compatível com PPc                              | 1132    | 326     | 311     | 450     |
| Não compatível                                  | 460     | 910     | 570     | 383     |
| Sem informação                                  | 606     | -       | 1995    | 556     |
| <b>Contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup></b> |         |         |         |         |
| > 200 células/mm <sup>3</sup>                   | 619     | 919     | 402     | 351     |
| 51-200 células/mm <sup>3</sup>                  | 1346    | 569     | 858     | 428     |
| ≤ 50 células/mm <sup>3</sup>                    | 877     | -       | 570     | 444     |
| Sem informação                                  | 991     | 415     | 311     | 478     |
| <b>Evolução clínica</b>                         |         |         |         |         |
| Positiva                                        | 1367    | 573     | 737     | 450     |
| Negativa                                        | 1052    | 415     | 1789    | 565     |
| Sem informação                                  | 862     | 915     | 405     | 437     |

## 11.2. SAM

### 11.2.1. Casos clínicos em estudo

Outra vertente deste trabalho era a determinação do potencial da SAM, como marcador de diagnóstico da PPc. É de referir que, devido à existência de problemas com o kit ELISA utilizado (SAM ELISA Kit, Wuhan EIAab Science Co., Ltd.), nomeadamente a formação de precipitado no fundo dos poços da microplaca, consequentemente afectando a sua leitura óptica, apenas foram estudadas 70 das 145 amostras referidas.

No **quadro XIII** encontram-se as características dos doentes em estudo, divididas pelos diferentes grupos, consoante o resultado do diagnóstico laboratorial da PPc (**quadro XIV**). Dos 70 doentes, 45 (64%) referem-se a casos de PPc (44 confirmados e um caso com apresentação clínica atípica) e 25 (36%) referentes a doentes com outra patologia pulmonar que não PPc (10 colonizados por P.j. apresentando infecção subclínica e 15 doentes não infectados por P.j.). Como grupo de controlo para quantificação de SAM como biomarcador de PPc, utilizaram-se 8 amostras de dadores saudáveis. Os resultados do diagnóstico laboratorial encontram-se no quadro XIV

**Quadro XIII.** Características clínicas dos doentes em estudo para a SAM.

|                                                                 | Casos PPc positivos |                    | Casos PPc negativos |                     |
|-----------------------------------------------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
|                                                                 | Grupo A<br>(n = 44) | Grupo B<br>(n = 1) | Grupo C<br>(n = 10) | Grupo D<br>(n = 15) |
| Sexo masculino/feminino                                         | 27/17               | 0/1                | 8/2                 | 13/2                |
| Média idade (mediana), anos                                     | 43 (43)             | 54                 | 33 (38)             | 40 (40)             |
| <b>Diagnóstico clínico<sup>a</sup>, n (%)</b>                   |                     |                    |                     |                     |
| Compatível                                                      | 44 (100)            | -                  | 0                   | 11 (73)             |
| Não compatível                                                  | -                   | 1 (100)            | 10 (100)            | 4 (27)              |
| <b>Condições associadas ao estado de imunossupressão, n (%)</b> |                     |                    |                     |                     |
| VIH                                                             | 42 (96)             | 1 (100)            | 8 <sup>b</sup> (80) | 12 (80)             |
| Tumor                                                           | 1 (2)               | 0                  | 1 <sup>b</sup> (10) | 0                   |
| Transplante                                                     | 1 (2)               | 0                  | 0                   | 3 (20)              |
| Outra                                                           | 0                   | 0                  | 2 (20)              | 0                   |
| <b>PaO<sub>2</sub>, n (%)</b>                                   |                     |                    |                     |                     |
| ≤ 65 mmHg                                                       | 23 (52)             | 0                  | 0                   | 2 (13)              |
| > 65 mmHg                                                       | 11 (25)             | 1 (100)            | 5 (50)              | 7 (47)              |
| Sem informação                                                  | 10 (23)             | 0                  | 5 (50)              | 6 (40)              |
| <b>Radiograma do tórax, n (%)</b>                               |                     |                    |                     |                     |
| Compatível com PPc                                              | 41 (93)             | 0                  | 3 (30)              | 7 (47)              |
| Não compatível                                                  | 1 (2)               | 1 (100)            | 6 (60)              | 5 (33)              |
| Sem informação                                                  | 2 (5)               | 0                  | 1 (10)              | 3 (20)              |
| <b>Contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, n (%)</b>          |                     |                    |                     |                     |
| > 200 células/mm <sup>3</sup>                                   | 1 (2)               | 1 (100)            | 6 (60)              | 2 (13)              |
| 51-200 células/mm <sup>3</sup>                                  | 20 (46)             | 0                  | 2 (20)              | 3 (20)              |
| ≤ 50 células/mm <sup>3</sup>                                    | 10 (23)             | 0                  | 1 (10)              | 3 (20)              |
| Sem informação                                                  | 13 (29)             | 0                  | 1 (10)              | 7 (47)              |
| <b>Evolução clínica, n (%)</b>                                  |                     |                    |                     |                     |
| Positiva                                                        | 15 (34)             | 0                  | 1 (10)              | 2 (13)              |
| Negativa                                                        | 6 (14)              | 0                  | 1 (10)              | 1 (7)               |
| Sem informação                                                  | 23 (52)             | 1 (100)            | 8 (80)              | 12 (80)             |

a) Febre, dispneia, tosse não produtiva; b) Um doente apresenta mais que uma condição imunossupressora (VIH e tumor).

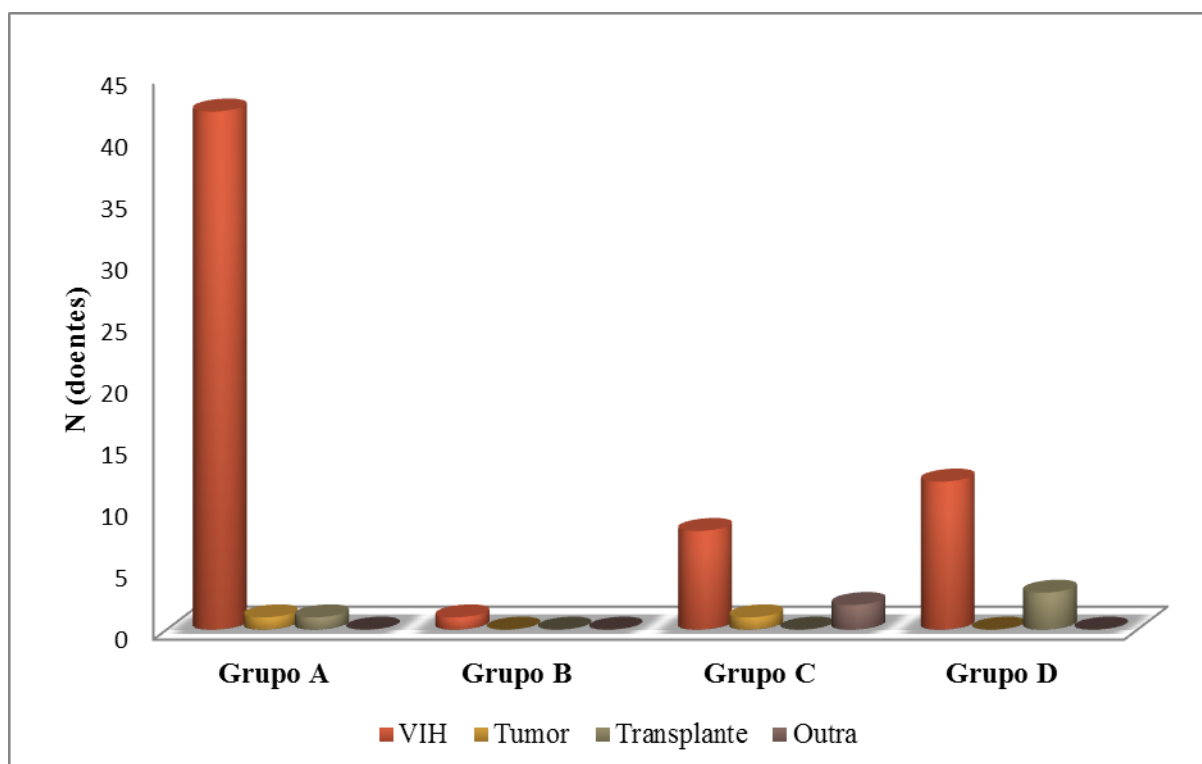
A PaO<sub>2</sub> inferior a 65 mmHg, foi significativamente associada aos doentes com PPc ( $P = 0,001$ ), assim como a contagem dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> inferiores a 200 células/mm<sup>3</sup>, quando comparada com os doentes com outras patologias pulmonares ( $P = 0,029$ ).

**Quadro XIV.** Resultados do diagnóstico laboratorial.

|                                                     | Casos PPc positivos |                    | Casos PPc negativos |                     |
|-----------------------------------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
|                                                     | Grupo A<br>(n = 44) | Grupo B<br>(n = 1) | Grupo C<br>(n = 10) | Grupo D<br>(n = 15) |
| <b>Carga parasitária<sup>a</sup>, n (%)</b>         |                     |                    |                     |                     |
| Baixa                                               | 19 (43)             | 0                  | 10 (100,0)          | -                   |
| Moderada                                            | 20 (46)             | 0                  | -                   | -                   |
| Alta                                                | 5 (11)              | 1 (100)            | -                   | -                   |
| <b>Deteção molecular de P.j.<sup>b</sup>, n (%)</b> |                     |                    |                     |                     |
| Positiva                                            | 44 (100)            | 1 (100)            | 10 (100)            | -                   |
| Negativa                                            | -                   | -                  | -                   | 15 (100)            |

a) IFI/AcM; b) PCR

A PPc foi diagnosticada em 43 (72%) de 60 doentes seropositivos para VIH, e em dois (57%) de sete doentes seronegativos para VIH, embora com outras causas de imunodeficiência (um caso com doença tumoral e um doente transplantado). Em dez doentes (oito seropositivos para VIH, um dos quais com historial tumoral e dois doentes com idades de seis e sete anos), cuja análise parasitológica foi negativa, embora com deteção molecular de P.j. positiva, foram classificados como casos de colonização subclínica ou infecção assintomática por P.j. (**figura 13**).



**Figura 13.** Distribuição dos casos clínicos em função das condições associadas ao estado de imunossupressão.

Quanto à caracterização demográfica das amostras, estas provinham de doentes com idades compreendidas entre os 4 e 68 anos, de ambos os sexos, sendo 22 do sexo feminino (31%) e 48 do sexo masculino (69%). No **quadro XV**, estão representadas as faixas etárias dos doentes, em função do diagnóstico.

**Quadro XV.** Distribuição dos casos clínicos em estudo consoante o grupo etário.

| Grupo Etário (anos) | Casos PPc positivos |                  | Casos PPc negativos |                  |
|---------------------|---------------------|------------------|---------------------|------------------|
|                     | Grupo A<br>N (%)    | Grupo B<br>N (%) | Grupo C<br>N (%)    | Grupo D<br>N (%) |
| 0 – 4               | 0                   | 0                | 0                   | 1 (7)            |
| 5 – 9               | 0                   | 0                | 2 (20)              | 0                |
| 10 – 19             | 1 (2)               | 0                | 0                   | 0                |
| 20 – 29             | 3 (7)               | 0                | 0                   | 3 (20)           |
| 30 – 39             | 16 (36)             | 0                | 5 (50)              | 3 (20)           |
| ≥ 40                | 24 (55)             | 1 (100)          | 3 (30)              | 8 (53)           |
| <b>Total</b>        | 44 (100)            | 1 (100)          | 10 (100)            | 15 (100)         |

### 11.2.2. Análise dos níveis serológicos de SAM

Como se verifica no **quadro XVI**, o grupo de doentes com PPc apresenta a mediana mais baixa (38 nM), distinguindo-se dos doentes negativos para PPc (60 nM) e dos dadores de sangue (75 nM).

**Quadro XVI.** Medianas dos níveis de SAM (nM).

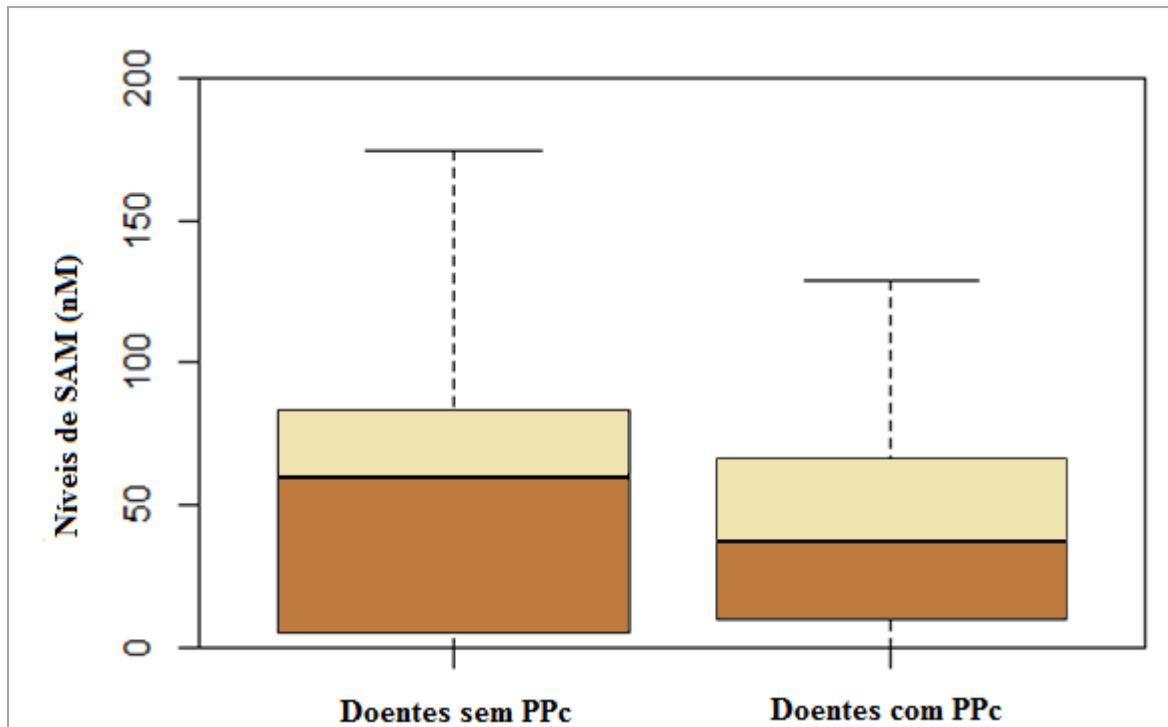
|                        | N (%)   | SAM (nM) |
|------------------------|---------|----------|
| <b>Doentes com PPc</b> | 45 (64) | 38       |
| <b>Doentes sem PPc</b> | 25 (36) | 60       |
| <b>Dadores</b>         | 8       | 75       |

Os doentes com PPc, subdivididos nos casos confirmados (**grupo A**) e casos com apresentação clínica atípica de PPc (**grupo B**), apresentam medianas de 32 nM e 45 nM. No que diz respeito aos doentes sem PPc, subdivididos nos casos de colonização subclínica (**grupo C**) e doentes com outras patologias pulmonares (**grupo D**), as medianas são de 55 nM e 60 nM, respectivamente (**quadro XVII**).

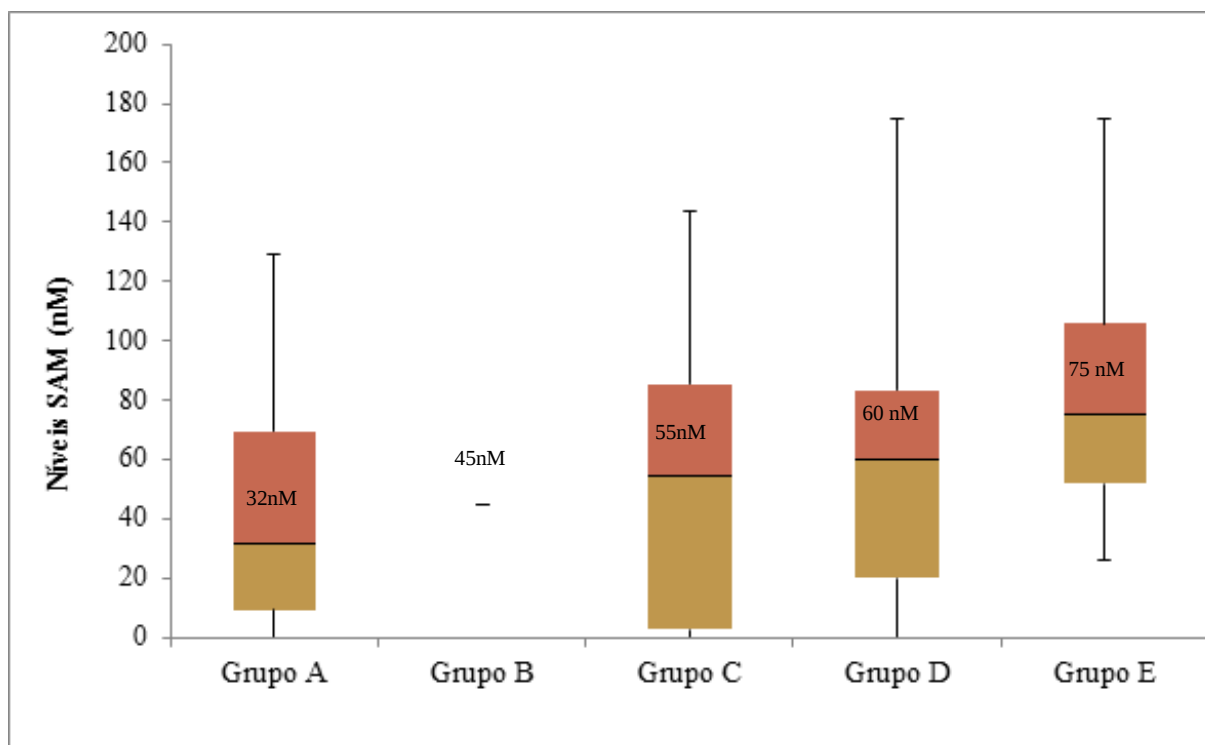
**Quadro XVII.** Medianas dos níveis de SAM (nM) nos diferentes grupos de amostras estudadas.

|                | N (%)   | SAM (nM) |
|----------------|---------|----------|
| <b>Grupo A</b> | 44 (63) | 32       |
| <b>Grupo B</b> | 1 (1)   | 45       |
| <b>Grupo C</b> | 10 (14) | 55       |
| <b>Grupo D</b> | 15 (22) | 60       |

Na figura 14 e 15, é possível verificar a distribuição dos níveis de SAM consoante os grupos clínicos distintos.



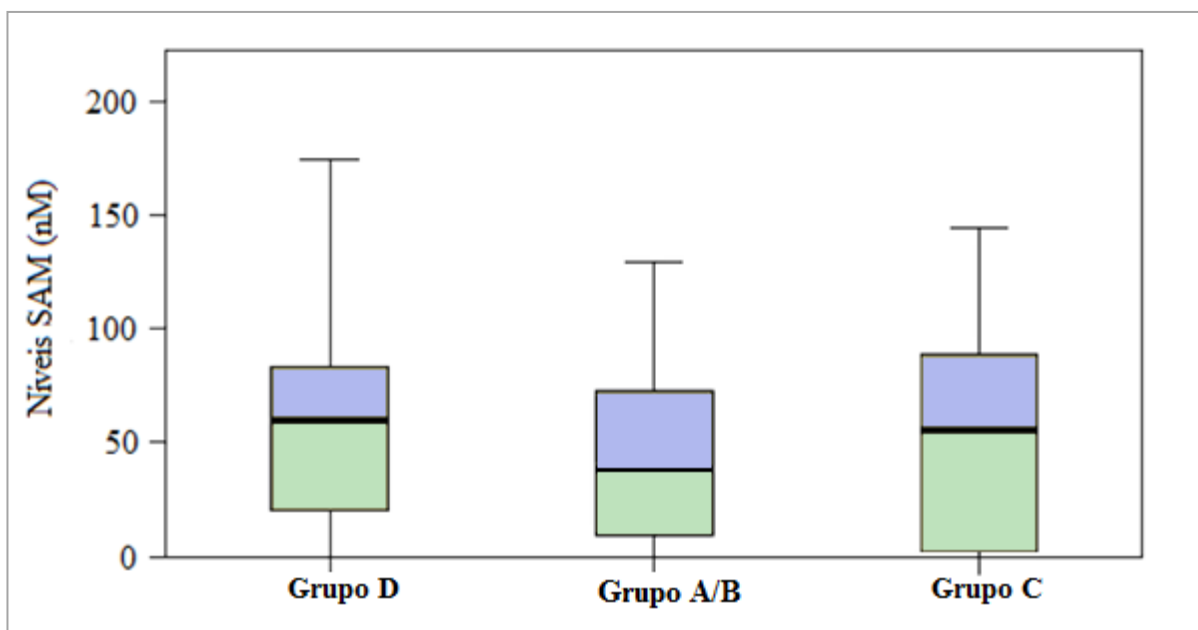
**Figura 14.** Representação gráfica da distribuição dos níveis de SAM nos casos com PPc e nos doentes sem PPc, em que cada *box-and-wisker plot* apresenta o segundo e terceiro quartil ( $Q_{2/4}$  e  $Q_{3/4}$ ), a mediana, e o primeiro e quarto quartil ( $Q_{1/4}$  e  $Q_{4/4}$ ). Não houve significância estatística entre os níveis serológicos de SAM, pelo que o teste de Mann-Whitney não rejeitou a hipótese nula de que a distribuição de SAM é a mesma entre os doentes dos diferentes grupos ( $P = 0,535$ ).



**Figura 15.** Representação gráfica da distribuição dos níveis de SAM nos diferentes grupos clínicos, em que cada *box-and-wisker plot* apresenta o segundo e terceiro quartil ( $Q_{2/4}$  e  $Q_{3/4}$ ), a mediana, e o primeiro e quarto quartil ( $Q_{1/4}$  e  $Q_{4/4}$ ).

### **Casos PPc e casos com infecção assintomática por P.j.**

A partir da utilização do teste de Kruskal-Wallis, avaliou-se a relação entre os níveis de SAM dos casos de PPc (grupo A/B) e os casos com infecção assintomática por P.j. (grupo C), comparando com os doentes sem PPc (grupo D). A hipótese nula de que exista igualdade entre os valores medianos de SAM para estes grupos clínicos não foi rejeitada (**figura 16**).



**Figura 16.** Representação gráfica da distribuição dos níveis de SAM dos casos PPc (grupo A/B), assintomáticos (grupo C) e casos PPc negativos (grupo D), em que cada *box-and-whisker plot* apresenta o segundo e terceiro quartil ( $Q_{2/4}$  e  $Q_{3/4}$ ), a mediana, e o primeiro e quarto quartil ( $Q_{1/4}$  e  $Q_{4/4}$ ). O teste de Kruskal-Wallis não rejeitou a hipótese nula de que a variação dos valores medianos de KL-6 entre os grupos é igual ( $P = 0,801$ ).

No **quadro XVIII** encontram-se os diferentes valores de *cut-off* estudados para este marcador.

**Quadro XVIII.** Níveis serológicos de SAM (nM) para o diagnóstico de PPc. Análise de diferentes valores de *cut-off*.

| SAM (nM) | Especificidade | Sensibilidade | VPN  | VPP  | P <sup>1</sup> |
|----------|----------------|---------------|------|------|----------------|
| 20       | 68,0           | 44,4          | 40,5 | 71,4 | 0,309          |
| 40       | 52,0           | 51,1          | 37,1 | 65,7 | 0,803          |
| 60       | 44,0           | 68,9          | 44,0 | 68,9 | 0,281          |
| 80       | 36,0           | 77,8          | 47,4 | 68,6 | 0,214          |
| 100      | 12,0           | 86,7          | 33,3 | 63,9 | 0,873          |

Especificidade – % de doentes sem PPc, correctamente identificados pelo teste como PPc negativos; Sensibilidade – % de doentes com PPc, correctamente diagnosticados pelo teste; VPN – valor preditivo negativo, refere-se à percentagem de doentes negativos pelo teste que, efectivamente, não têm PPc; VPP – valor preditivo positivo, refere-se à percentagem de doentes positivos pelo teste que, efectivamente têm PPc; <sup>1</sup> Calculado pelo teste do Chi-quadrado ( $\chi^2$ ).

A sensibilidade e especificidade estão dependentes do valor de *cut-off* abaixo do qual este teste é positivo. No que diz respeito a este marcador, não é possível determinar um valor de *cut-off* adequado, isto é, com níveis de sensibilidade e especificidade compatíveis com uma metodologia para avaliação da infecção por P.j..

De seguida, procedeu-se à análise da variação dos níveis de SAM nos diferentes grupos em estudo, consoante as características clínicas.

### **Condições associadas ao estado de imunossupressão**

No **quadro XIX** encontram-se as medianas de SAM para os grupos estudados, consoante o tipo de condição associada à imunossupressão.

Dos 10 doentes PPc negativos, mas portadores assintomáticos de P.j. (Grupo C), duas crianças de sete anos de idade e doença imunológica de etiologia desconhecida; dois indivíduos seropositivos para VIH, com contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> entre 51 a 200 células/mm<sup>3</sup>; e um indivíduo seropositivo, com doença tumoral, apresentaram valores de SAM superiores a 80 nM.

**Quadro XIX.** Medianas dos níveis de SAM (nM) nos diferentes grupos de amostras estudadas, em função das condições associadas à imunossupressão.

|                    | Níveis de SAM (nM) |         |         |         |
|--------------------|--------------------|---------|---------|---------|
|                    | Grupo A            | Grupo B | Grupo C | Grupo D |
| <b>VIH</b>         | 32                 | 45      | 21      | 23      |
| <b>Tumor</b>       | 46                 | -       | 83      | -       |
| <b>Transplante</b> | 10                 | -       | -       | 111     |
| <b>Outra</b>       | -                  | -       | 119     | -       |

### **Carga parasitária**

Os níveis de SAM em função da carga parasitária moderada (**quadro XX**) foram inferiores aos valores obtidos nos doentes com carga parasitária baixa. No entanto, no que diz respeito aos casos com carga parasitária alta, os valores foram superiores, sendo que, dois dos 5 casos do grupo A apresentaram valores de SAM no sangue superiores a 120nM. O teste de Krustal-Wallis não rejeitou a hipótese nula de que existe igualdade da distribuição dos valores medianos de SAM nos diferentes grupos de carga parasitária ( $P = 0,192$ ).

**Quadro XX.** Medianas dos níveis de SAM (nM) nos diferentes grupos de amostras, em função da carga parasitária.

| Carga parasitária | Níveis de SAM (nM) |         |         |         |
|-------------------|--------------------|---------|---------|---------|
|                   | Grupo A            | Grupo B | Grupo C | Grupo D |
|                   | Mediana            | Mediana | Mediana | Mediana |
| <b>Baixa</b>      | 42                 | -       | 55      | -       |
| <b>Moderada</b>   | 13                 | -       | -       | -       |
| <b>Alta</b>       | 61                 | 45      | -       | -       |

### **Parâmetros clínicos**

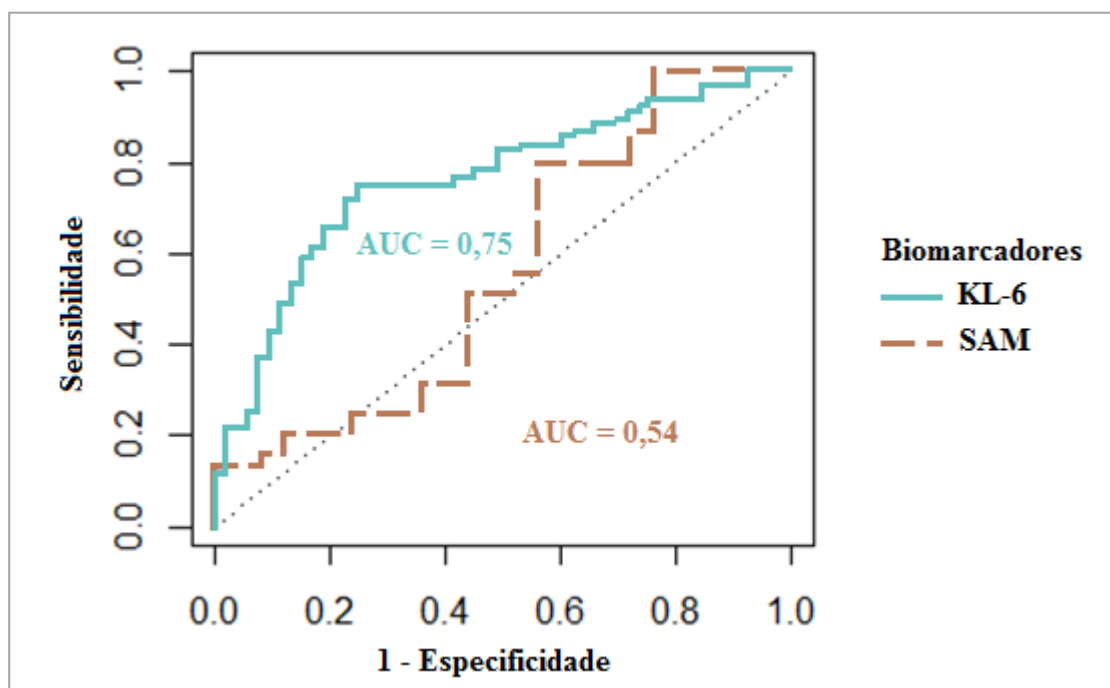
No **quadro XXI** observa-se que os níveis de SAM em alguns parâmetros tendem em ser inferiores nos casos de PPc (grupo A e B) quando comparados com os restantes, embora sem apresentar níveis de significância, nomeadamente no que diz respeito ao diagnóstico clínico (32 nM *versus* 60 nM, referentes aos doentes sem infecção por P.j.); nos doentes com contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> inferiores a 50 células/mm<sup>3</sup> (17 nM *versus* 71 nM, referentes aos doentes sem infecção por P.j.) e nos casos em que o radiograma do tórax apresentou um infiltrado difuso bilateral, compatível com o diagnóstico de PPc (41 nM *versus* 73 e 60 nM, casos com infecção assintomática e sem infecção por P.j., respectivamente).

Em relação aos doentes sem PPc (grupo C e D), é de referir uma elevação dos valores em alguns parâmetros, nomeadamente nos casos com apresentação de diagnóstico (60 nM) e radiograma (73 nM para o grupo C e 60 nM para o grupo D) compatíveis com PPc, e nos doentes que apresentaram evolução clínica negativa (94 nM para o grupo C e 60 nM para o grupo D).

**Quadro XXI.** Medianas dos níveis de SAM (nM) em função das diferentes características clínicas.

| Níveis SAM (nM)                                 | Grupo A | Grupo B | Grupo C | Grupo D |
|-------------------------------------------------|---------|---------|---------|---------|
| <b>Diagnóstico clínico</b>                      |         |         |         |         |
| Compatível                                      | 32      | -       | -       | 60      |
| Não compatível                                  | -       | 45      | 55      | 46      |
| <b>PaO<sub>2</sub></b>                          |         |         |         |         |
| ≤ 65 mmHg                                       | 17      | -       | -       | 20      |
| > 65 mmHg                                       | 38      | 45      | 2       | 26      |
| Sem informação                                  | 36      | -       | 86      | 71      |
| <b>Radiograma do tórax</b>                      |         |         |         |         |
| Compatível com PPc                              | 41      | -       | 73      | 60      |
| Não compatível                                  | 27      | 45      | 19      | 26      |
| Sem informação                                  | 10      | -       | 144     | 21      |
| <b>Contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup></b> |         |         |         |         |
| > 200 células/mm <sup>3</sup>                   | 85      | 45      | 54      | 30      |
| 51-200 células/mm <sup>3</sup>                  | 63      | -       | 44      | 26      |
| ≤ 50 células/mm <sup>3</sup>                    | 17      | -       | 0       | 71      |
| Sem informação                                  | 12      | -       | 94      | 60      |
| <b>Evolução clínica</b>                         |         |         |         |         |
| Positiva                                        | 59      | -       | 2       | 46      |
| Negativa                                        | 82      | -       | 94      | 60      |
| Sem informação                                  | 11      | 45      | 55      | 43      |

### Curvas de ROC



**Figura 17.** Representação gráfica da curva de ROC para o KL-6 e SAM. A área abaixo da curva (AUC) foi de 75% para o KL-6 e 54% para a SAM com um intervalo de confiança de 95%.

Comparando ambos os marcadores, através das suas curvas de ROC (**figura 17**), verificou-se que a AUC da curva ROC, determinada pela relação estatística Wilcoxon-Mann-Whitney, está associada ao poder discriminante do teste diagnóstico, em que, neste caso, com um nível de significância de 95%, a AUC para o KL-6 (75%) é estatisticamente mais significativa ( $P = 0,038$ ) que a AUC para a SAM (54%).

## 12. Discussão e considerações finais

### 12.1. Discussão

Após análise de 145 amostras de soro e espécimes pulmonares, através das quais foram diagnosticados 92 casos de PPc, foram testadas para pesquisa de dois marcadores serológicos, KL-6 e SAM, de forma a analisar a sua capacidade no auxílio do diagnóstico da PPc.

Este estudo revelou uma elevada sensibilidade e especificidade do ensaio ELISA em amostras serológicas para quantificação de KL-6, tornando-o num possível indicador para a PPc. Embora estes resultados demonstrem boa sensibilidade e especificidade do KL-6, tal não aconteceu com a SAM, na medida em que não é possível, com os resultados obtidos, estabelecer uma relação significativa entre os valores serológicos de SAM e os diferentes casos clínicos, pois, embora se note uma diferença ao nível das medianas entre os grupos, existe uma grande dispersão de valores. Assim sendo, este biomarcador não apresenta as condições necessárias para ser utilizado como auxiliar no diagnóstico da PPc, tal como fora anteriormente reportado por Boer *et al.* (2010). Por outro lado, o KL-6 poderá ser utilizado como um indicador de PPc, e os seus níveis podem ser facilmente medidos no soro de doentes com suspeita de infecção por P.j..

De forma a haver uma melhor compreensão dos resultados obtidos, optou-se por uma análise em separado dos resultados obtidos.

#### 12.1.1. Análise de KL-6

Sabe-se que o KL-6 é uma mucina expressa normalmente nos pneumócitos do tipo II e células epiteliais dos bronquíolos do pulmão saudável. Diversos estudos indicam que, no caso de lesão pulmonar, como casos de fibrose pulmonar idiopática, sarcoidose pulmonar e pneumonias com dano alveolar difuso ou padrão de pneumonia intersticial crónica, esta mucina é sobreexpressa. Kohno *et al.* (1989) especularam que esta variação dos níveis serológicos de KL-6 poderá reflectir o dano tecidual nas células periféricas do tecido pulmonar. Imai *et al.* (2002) confirmaram a medição dos níveis séricos de KL-6 como indicador sensível para a severidade da pneumonia intersticial no adulto, sendo actualmente utilizado no Japão, como complemento ao diagnóstico de pneumonia intersticial activa.

### **a) Relação entre os valores de KL-6 e os diferentes grupos clínicos**

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que, tal como Shimizu *et al.* (2009) relataram, é possível utilizar os níveis serológicos de KL-6 para distinguir entre doentes com PPc e doentes sem esta doença, mas com outra patologia pulmonar. No entanto, embora estes autores refiram que os seus resultados não possibilitaram a distinção entre casos PPc e casos de colonização subclínica, os resultados obtidos neste estudo, relatam o inverso, apresentando uma distinção significativa ( $P < 0,001$ ) entre os níveis de KL-6 dos doentes com PPc e dos doentes colonizados.

Outro problema no diagnóstico da PPc é a existência de casos com apresentação clínica atípica de PPc, cujo diagnóstico clínico é inconclusivo e difuso. A avaliação dos níveis de KL-6, no entanto, não é capaz de distinguir estes casos dos casos PPc negativos, na medida em que apresentam medianas muito próximas. A análise estatística efectuada não possibilitou a distinção significativa entre os casos atípicos e os casos sem infecção por P.j.. Dentro dos cinco casos atípicos, verificou-se que dois deles possuíam níveis de KL-6 inferiores a 250 U/mL.

A análise da distribuição dos níveis de KL-6 nos diferentes grupos clínicos permitiu a associação estatística deste biomarcador com os casos diagnosticados de PPc, na medida em que se determinou um valor de *cut-off* de 590 U/mL, acima do qual este teste é positivo, resultando numa especificidade de 76% e sensibilidade de 71%. Sendo um marcador actualmente utilizado como indicador da severidade de diversas pneumonias intersticiais, estes resultados, embora com algumas restrições, indicam que o KL-6 poderá ser de grande importância também para a PPc.

Os níveis séricos de KL-6 determinados foram superiores nos doentes com PPc confirmada, seguidos pelos doentes com PPc atípica, portadores assintomáticos de P.j., doentes sem PPc e, por fim, os dadores de sangue, em que a análise estatística efectuada rejeitou a hipótese de uma distribuição igual dos níveis de KL-6 entre os grupos clínicos.

## **b) Relação entre os valores de KL-6 e as diferentes condições associadas à imunossupressão**

Segundo o *European Center for Disease prevention and Control* (ECDC), a PPc continua a ser a doença definidora de sida mais comum, sendo responsável pela identificação de 25% de novos casos no Espaço Económico Europeu, em 2010 [European Centre for Disease Prevention and Control, 2011]. No presente estudo, verificou-se que 66%, dos doentes seropositivos para VIH estudados, com suspeita de doença pulmonar, desenvolveram PPc. Além destes, foram estudados casos de doentes submetidos a transplante ou com doença tumoral, na medida em que os valores de KL-6 obtidos nas diferentes condições associadas à imunossupressão tendem a distinguir-se entre o diagnóstico de PPc e os casos de doentes com outra patologia pulmonar.

No que diz respeito aos dois doentes PPc confirmados e com doença tumoral, observou-se um valor de KL-6 superior a 3000 U/mL, o que é consistente com o facto de o KL-6 ser um antigénio relacionado com o adenocarcinoma pulmonar, e também cancros da mama e pâncreas. Das amostras estudadas, apenas um portador assintomático de P.j. possuía doença tumoral e, apesar de não apresentar elevação do nível de KL-6, não é possível estabelecer uma relação significativa com o reduzido número de amostras estudadas para estes casos.

Ainda no que diz respeito aos doentes com PPc confirmada, existem dois casos que apresentaram o nível de KL-6 inferior (383 U/mL) ao dos restantes doentes com PPc e outras condições associadas à imunossupressão. É de referir, no entanto, de que estes casos correspondem a duas crianças de nove e dezoito meses, em que o sistema imunitário ainda é imaturo, o que poderá afectar os níveis de KL-6. Do ponto de vista teórico, sabe-se que durante a resposta inflamatória efectora, embora necessária para controlar a pneumocistose, quando em excesso, promove danos pulmonares severos levando à produção de KL-6.

## **c) Relação entre os valores de KL-6 e a carga parasitária**

A análise estatística permitiu a observação de diferenças significativas dos valores medianos entre os diferentes grupos estudados. Esta distinção clara resultou numa apresentação de valores de KL-6 crescente em função da carga parasitária, na medida em que os valores medianos dos doentes com carga parasitária alta foram superiores aos doentes com

carga parasitária moderada, e estes últimos, superiores aos doentes com carga parasitária baixa.

No que diz respeito aos doentes com carga parasitária moderada, os níveis medianos de KL-6 nos casos com apresentação clínica atípica de PPc foram bastante inferiores quando comparados com os casos confirmados de PPc, devido a dois doentes cujos valores de KL-6 foram inferiores a 250 U/mL.

É de salientar, também, a diferença, embora que não acentuada, dos valores medianos de KL-6 referentes à carga parasitária baixa, entre os casos confirmados de PPc e os doentes com infecção assintomática de P.j., o que indica que este biomarcador poderá ser extremamente útil na distinção entre estas duas situações clínicas, tendo implicação positiva na escolha de um tratamento adequado.

#### **d) Relação entre os valores de KL-6 e os parâmetros clínicos**

Este trabalho permitiu detectar algumas associações estatisticamente significativas entre os níveis de KL-6 e alguns parâmetros da infecção por P.j., como o diagnóstico clínico, PaO<sub>2</sub>, radiograma do tórax, contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e evolução clínica.

Constatou-se que, em todos os parâmetros estudados, a concentração de KL-6 nos doentes sem infecção por P.j. foi, de certo modo constante, e na maioria inferior a 500 U/mL, salvo duas excepções com valores próximos a 560 U/mL; no entanto, sempre inferior ao valor de *cut-off* (590 U/mL) determinado neste estudo.

#### **Diagnóstico clínico**

No que diz respeito ao diagnóstico clínico, tal como observado em outros parâmetros já descritos, verifica-se uma clara distinção dos valores medianos de KL-6 dos doentes com apresentação clínica atípica (415 U/mL) e os doentes com PPc confirmada (991 U/mL), levando a colocar a hipótese de que estes níveis possam, de alguma forma, estar relacionados com casos menos severos. É de salientar, novamente, a distinção dos valores medianos entre os casos confirmados de PPc (991 U/mL) e os doentes com infecção assintomática por P.j. (409 U/mL).

### **Pressão parcial do oxigénio no sangue periférico**

É interessante verificar que, tal como a PaO<sub>2</sub> inferior a 65 mmHg, foi significativamente associada aos doentes com PPc, o mesmo aconteceu com os níveis obtidos para o KL-6. Além disso, mesmo nos doentes com PaO<sub>2</sub> superior a 65 mmHg, os níveis obtidos de KL-6 foram consideravelmente superiores (954 U/mL) nos doentes confirmados de PPc, quando comparados com os casos com infecção assintomática (542 U/mL), doentes sem infecção por P.j. (444 U/mL) e, uma vez mais, em relação aos doentes com apresentação clínica atípica de PPc (415 U/mL).

### **Radiograma do tórax**

Verificou-se uma elevada concentração de KL-6 nos doentes com PPc e radiograma do tórax compatível com PPc, sendo que nos casos com radiograma não compatível, o nível mediano observado foi inferior.

### **Contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup>**

No decorrer do presente estudo, a concentração de KL-6 foi surpreendentemente superior nos casos com contagem de linfócitos entre 51 e 200 células/mm<sup>3</sup>, comparando com a contagem de linfócitos inferior a 50 células/mm<sup>3</sup>. Tal facto sucedeu nos casos confirmados de PPc e nos doentes com infecção assintomática por P.j.. Do ponto de vista teórico, sabe-se que esta proteína é também expressa em linfócitos T activos ou inactivos [Mukherjee *et al.*, 2005], pelo que se coloca a hipótese de que os níveis de KL-6 poderão ser afectados com contagens de linfócitos demasiado baixas. Não obstante, nos doentes não infectados por P.j. os níveis de KL-6 mantiveram-se, de certo modo, constantes nas diferentes contagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, pelo que deverão existir outros factores que influenciem esta variação.

### **Evolução clínica**

É interessante verificar que as concentrações de KL-6 nos doentes com PPc e evolução clínica favorável são superiores aos valores medianos dos doentes com evolução clínica desfavorável. Embora se saiba que esta molécula é libertada também pelos pneumócitos do tipo II em regeneração, poderão existir outros factores que conduzem ao aumento dos níveis de KL-6.

Mas a situação inverte-se nos doentes com infecção assintomática por P.j., nas quais os valores de KL-6 são superiores no caso de evolução clínica desfavorável, comparativamente aos casos com evolução favorável. No entanto, é de referir que, apenas foram estudados dois doentes com infecção assintomática por P.j. e evolução desfavorável, não possibilitando uma análise mais aprofundada.

### 12.1.2. Análise da SAM

Do ponto de vista teórico sabe-se que a SAM possui um papel importante nos processos biológicos de metilação em todos os organismos, servindo como dador do grupo metil utilizado na modificação covalente do DNA e proteínas. *Pneumocystis* aparenta ser extremamente dependente de SAM exógena, apesar de existirem publicações que contradizem essa necessidade [Kutty *et al.*, 2008]. No caso da pneumocistose, a concentração de SAM extracelular apresenta-se substancialmente inferior, comparando com a situação biológica normal. Diversos estudos testaram a SAM para distinção ente os doentes com PPc dos doentes sem esta doença [Skelly *et al.*, 2008; Boer *et al.*, 2010]. No entanto, estudos mais recentes não obtiveram resultados viáveis., não sendo capazes de efectuar esta distinção entre os diferentes casos clínicos [Boer *et al.*, 2010].

Tal como fora anteriormente referido, devido ao surgimento de problemas com o kit ELISA utilizado, com formação de um precipitado no fundo dos poços da microplaca e, consequentemente, afectando a sua leitura óptica, apenas foram estudadas 70 das 145 amostras referidas, para as quais os resultados apresentaram qualidade para serem considerados.

#### a) Relação entre os valores de SAM e os diferentes grupos em estudo

Comparando os três grandes grupos clínicos em estudo: casos de PPc, doentes sem PPc e dadores de sangue, observa-se uma ligeira variação dos níveis de SAM, na medida em que os dadores apresentaram a mediana mais elevada (75nM), diminuindo nos doentes sem PPc (60nM) e por fim os doentes com PPc (38nM). Aprofundando os grupos, e separando os casos PPc em casos confirmados e casos com apresentação atípica de PPc, nota-se um ligeiro aumento da concentração nos casos atípicos, no entanto, o número de amostras é demasiado reduzido para uma análise profunda. Os níveis mais elevados mantêm-se nos doentes sem PPc e nos casos com infecção assintomática por P.j.. De toda a forma, existe uma grande dispersão nos resultados obtidos que não possibilitou a determinação de um valor de *cut-off* adequado.

**b) Relação entre os valores de SAM e as diferentes condições associadas à imunossupressão**

Os níveis serológicos de SAM determinados para os doentes com diferentes condições associadas à imunossupressão, não permitiram uma distinção entre os grupos clínicos, verificou-se uma grande dispersão de resultados.

**c) Relação entre os valores de SAM e a carga parasitária**

Os níveis serológicos determinados para os doentes com carga parasitária baixa, apesar de muito próximos, apresentam uma ligeira diferença entre os doentes com PPc (42nM) e os doentes com infecção assintomática por P.j. (55nM). No entanto, embora se esperasse que os níveis de SAM diminuíssem com o aumento da carga parasitária, tendo em conta de que P.j. é dependente de SAM exógena, tal não foi observado, na medida em que os doentes com PPc e carga parasitária alta demonstraram valores medianos de KL-6 superiores (61nM).

**d) Relação entre os valores de SAM e os parâmetros clínicos**

Este trabalho não permitiu a detecção de associações estatisticamente significativas entre os níveis de SAM e alguns parâmetros da infecção por P.j.. Embora se tenha constatado que, em alguns parâmetros, os níveis de SAM para os doentes com PPc confirmada manifestaram-se ligeiramente inferiores relativamente aos outros grupos clínicos estudados, nomeadamente no que diz respeito ao diagnóstico clínico, pressão parcial de oxigénio, radiograma do tórax e contagem de linfócitos T CD4 inferiores a 50 células/mm<sup>3</sup>, não foi possível determinar uma relação estatística, devido à grande dispersão de valores.

Em relação ao grupo clínico de apresentação atípica de PPc, devido ao reduzido número de amostras, não foi possível estabelecer alguma relação com os resultados obtidos.

No que diz respeito aos doentes com infecção assintomática por P.j., observam-se níveis de SAM mais elevados, embora tal não se verifique em todos os parâmetros, devido à presença de três valores serológicos de SAM muito baixos (0 nM) em doentes que provavelmente possuem outra infecção além de P.j. que poderá ser a causa dos sintomas apresentados.

Por fim, nos doentes sem infecção por P.j., observam-se valores de SAM mais elevados. No entanto, tal como nos outros grupos clínicos, em alguns parâmetros, como a pressão parcial do oxigénio, radiograma do tórax, e contagem de linfócitos entre 51 e 200 células/mm<sup>3</sup>, os valores apresentaram-se inferiores a 30 nM, provavelmente devido a tratar-se de doentes com outra infecção respiratória.

## 12.2. Considerações finais

Nos últimos 20 anos houve um grande avanço no conhecimento do género *Pneumocystis*, especialmente no que diz respeito à taxonomia molecular e relações com a epidemiologia e fisiopatologia. Estas descobertas mudaram a visão convencional da infecção por P.j., particularmente a especificidade entre espécies, transmissão, reservatórios e fontes de infecção.

No que diz respeito ao diagnóstico laboratorial de PPc, o avanço mais importante, até à data, foi o desenvolvimento de ensaios PCR, altamente específicos e sensíveis. Este método possibilitou um diagnóstico mais sensível em indivíduos seronegativos para VIH que, muitas vezes, desenvolvem PPc apresentando cargas parasitárias baixas, e favoreceu a utilização de amostras obtidas por procedimentos menos invasivos, como o lavado oral e a expectoração induzida.

Este estudo tem por base a necessidade do desenvolvimento de métodos mais eficazes para o diagnóstico da PPc, utilizando amostras obtidas por meios menos invasivos, de forma a melhorar a qualidade de vida do doente. Como tal, a pesquisa de marcadores serológicos para auxílio do diagnóstico da PPc tem sido aprofundada durante os últimos anos, em que diversas moléculas foram testadas e algumas relatadas com potencial utilidade como o (1→3)-β-D-glucano, lactato desidrogenase, SAM e KL-6, sendo que, no presente estudo avaliaram-se os níveis serológicos de KL-6 e SAM em doentes com PPc e doentes com outras patologias pulmonares. O estudo destas alterações poderá ser útil no auxílio ao diagnóstico da PPc.

Sendo uma mucina com um papel importante na defesa e modulação do sistema imunitário das vias respiratórias, o KL-6 é o candidato ideal para um potencial marcador para a PPc. Diversos estudos reportaram o KL-6 como um indicador sensível de diversas doenças intersticiais do pulmão. Tasaka *et al.* (2007) observaram um nível de KL-6 elevado nos

doentes com PPc, afirmando, no entanto, que a elevada sensibilidade do KL-6 nas doenças intersticiais do pulmão poderá ser um entrave para a distinção do tipo de patologia pulmonar de que o doente padece. No presente estudo, a análise do KL-6 resultou numa considerável sensibilidade e especificidade, superiores a 70%.

Um grande problema no diagnóstico da PPc é a distinção entre os casos com a doença e aqueles com infecção assintomática pelo organismo *Pneumocystis*. Mesmo com a evolução dos métodos moleculares, nem sempre é possível distinguir estes casos, ou porque não é possível obter uma secreção pulmonar devido à condição do doente, ou quando existem cargas parasitárias muito baixas e difíceis de se visualizar pelos métodos parasitários. Shimizu *et al* (2009) procuraram distinguir estes casos utilizando diversos marcadores, nomeadamente o KL-6, mas sem sucesso. Todavia, neste trabalho, verificou-se uma significativa distinção entre estes grupos clínicos.

Nakamura *et al.* (2009) relataram que os níveis de KL-6 aparentam ser significativamente superiores nos doentes seropositivos para VIH com PPc, justificando este facto, pela progressão clínica da PPc ser mais rápida nos doentes seronegativos, que nos seropositivos. Estes resultados também foram verificados no presente trabalho, embora existam alguns casos de doença tumoral e com níveis de KL-6 superiores, o que coincide com o facto de esta molécula ser, também, libertada em alguns tipos de tumores.

Ainda no que diz respeito ao KL-6, neste trabalho estudou-se, também, a sua relação com os doentes com apresentação atípica de PPc, não se conseguindo distinguir estes casos dos doentes sem PPc, provavelmente porque se podem tratar de casos menos severos de PPc ou em fase inicial de desenvolvimento da doença.

Apesar de não distinguir com clareza todos os grupos clínicos, o KL-6 apresenta-se como um biomarcador promissor para o diagnóstico da PPc, nomeadamente para distinção entre os casos com e sem PPc, incluindo os portadores assintomáticos de P.j..

No que diz respeito à SAM, uma molécula de extrema importância nos processos biológicos de metilação, foi proposta, em 2003, como um marcador bioquímico para o diagnóstico da PPc, depois de Merali *et al.* (2000) relatarem a incapacidade de *Pneumocystis* para a sintetizar, mas possuindo mecanismos específicos para o seu transporte para o interior do microrganismo. No entanto, Kutty *et al.* (2008) afirmaram que *Pneumocystis* possui, de facto, o gene funcional da enzima responsável pela síntese de SAM, a S-Adenosilmetionina sintetase.

Apesar da controvérsia, o facto é que as concentrações extracelulares de SAM diminuem nos doentes com PPc. Diversos investigadores procuraram a relação entre os níveis de SAM nos doentes com PPc. Skelly *et al.* (2008) obtiveram uma sensibilidade e especificidade superiores a 90%, nos doentes com PPc e seropositivos para VIH. Por sua vez, Boer *et al.* (2010) testando a capacidade deste marcador como indicador para PPc em doentes imunocomprometidos seronegativos, verificaram, tal como no presente estudo, que a SAM é incapaz de distinguir estes casos, provavelmente devido às baixas cargas parasitárias apresentadas por estes doentes. No entanto, tendo em conta de que SAM é resultante do metabolismo humano, outros factores, como má nutrição, condição clínica e outras variáveis poderão afectar os seus níveis séricos.

É importante referir, também, a dificuldade na comparação entre estudos devido aos diferentes contextos clínicos, métodos de recolha de amostras, reagentes e técnicas laboratoriais. Ambos utilizaram técnicas de HPLC para quantificação de SAM, enquanto que, no presente trabalho se utilizou o método ELISA competitivo.

## 13. Perspectivas futuras

De futuro, novas investigações deverão ser realizadas, considerando um maior grupo de doentes, preferencialmente com diversas patologias pulmonares e não pulmonares. Para além do seu estudo complementar com outros potenciais marcadores, como o  $\beta$ -glucano, propõe-se a continuação do estudo do KL-6 e a comparação com os doentes com tumores, de modo a avaliar com maior exactidão as variações de concentração de KL-6.

No entanto, tendo em conta de que este método é já utilizado no Japão como auxiliar do diagnóstico de diversas pneumonias intersticiais, sugere-se a implementação deste teste como complemento do diagnóstico da PPc. A aplicação desta metodologia poderá facilitar a distinção entre casos PPc e doentes assintomáticos, auxiliando e adequando a escolha do tratamento mais indicado e, por isso, permitindo um melhor controlo da doença. Além disso, poderá ser um método a utilizar no caso de o doente se apresentar demasiado debilitado para se proceder à obtenção de secreções pulmonares, por conseguinte, complicando o diagnóstico.

No que diz respeito à SAM, visto existir alguma variação nos diferentes grupos clínicos estudados, propõe-se a utilização de ambos os métodos, ELISA e HPLC, e a continuação do estudo com um maior número de amostras de doentes com PPc e diferentes condições associadas à imunossupressão, de forma a procurar melhores respostas.

## 14. Referências bibliográficas

- Aliouat-Denis, C.-M., Chabé, M., Demanche, C., Aliouat, E. M., Viscogliosi, E., Guillot, J., et al. (2008). *Pneumocystis* species, co-evolution and pathogenic power. *Infection, Genetics and Evolution*, 8 (5), 708–726.
- Aliouat-Denis, C.-M., Martinez, A., Aliouat, E. M., Pottier, M., Gantois, N., & Dei-Cas, E. (2009). The *Pneumocystis* life cycle. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104 (3), 419–426.
- Beard, C. B., & Navin, T. R. (1996). Molecular epidemiology of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Emerging Infectious Diseases*, 2 (2), 147–150.
- Beard, C. B., Roux, P., Nevez, G., Hauser, P. M., Kovacs, J. A., Unnasch, T. R., et al. (2004). Strain typing methods and molecular epidemiology of *Pneumocystis* pneumonia. *Emerging Infectious Diseases*, 10 (10), 1729–1735.
- Benfield, T. L., Lundgren, B., Levine, S. J., Kronborg, G., Shelhamer, J. H., & Lundgren, J. D. (1997). The major surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii* induces release and gene expression of interleukin-8 and tumor necrosis factor alpha in monocytes. *Infection and Immunity*, 65 (11), 4790–4794.
- Boer, M. G. J. D., Gelinck, L. B. S., Zelst, B. D. V., Willems, L. N. A., Dissel, J. T. V., Jonge, R. D., et al. (2010).  $\beta$ -D-Glucan and S-Adenosylmethionine serum levels for the diagnosis of *Pneumocystis* Pneumonia in HIV-negative patients: a prospective study. *Journal of Infection*, 62 93–100.
- Boom, R., Sol, C. J. A., Salimans, M. M. M., Jansen, C. L., Wertheim-van Dillen, P. M. E., & Van der Noordaa, J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, 28 (3), 495–503.
- Briassoulis, G., Stefanaki, K., Peristeri, I., Endoh, Y., & Hatzis, T. (2003). Is KL-6 a serum indicator of early pulmonary fibrosis in childhood cancer patients? *Medical and Pediatric Oncology*, 40 (1), 44–47.
- Calderón, E. J. (2009). Epidemiology of *Pneumocystis* infection in Human. *Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology*, 19 (4), 270–275.
- Calderón, E. J., Gutiérrez-Rivero, S., Durand-Joly, I., & Dei-Cas, E. (2010). *Pneumocystis* infection in humans: diagnosis and treatment. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 8 (6), 683–701.
- Chabé, M., Dei-Cas, E., Creusy, C., Fleurisse, L., Respaldiza, N., Camus, D., et al. (2004). Immunocompetent hosts as a reservoir of *Pneumocystis* organisms: histological and rt-PCR data demonstrate active replication. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 23 (2), 89–97.
- Chinnappan, J., & Lakshmi, P. T. (2011). *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia. *Asian Journal of Experimental Biological Sciences*, 2 (2), 171–176.

- Costa, M. C., Esteves, F., Antunes, F., & Matos, O. (2006). Genetic characterization of the dihydrofolate reductase gene of *Pneumocystis jirovecii* isolates from Portugal. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58 (6), 1246–1249.
- Cushion, M. T. (2004). *Pneumocystis*: unraveling the cloak of obscurity. *Trends in Microbiology*, 12 (5), 243–249.
- De Souza, W., & Benchimol, M. (2005). Basic biology of *Pneumocystis carinii*: a mini review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100 (8), 903–908.
- Demanche, C., Berthelemy, M., Petit, T., Polack, B., Wakefield, A. N. N. E., Dei-cas, E., et al. (2001). Phylogeny of *Pneumocystis carinii* from 18 Primate Species Confirms Host Specificity and Suggests Coevolution. *Journal of Clinical Microbiology*, 39 (6), 2126–2133.
- Dei-Cas, E., Fleurisse, L., Aliouat, E. M., Bahun-Le Capon, J., Cailliez, J. C., & Creusy, C. (1998) Morphological and ultrastructural methods for *Pneumocystis*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 22, 185–189.
- Durand-Joly, I., Aliouat, E. M., Recourt, C., Guyot, K., François, N., Wauquier, et al. (2002). *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* is not infectious for SCID mice. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (5), 1862–1865.
- Engvall, E. & Perlmann, P. (1971). Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8, 871-875.
- Esgalhado, R., Esteves, F., Antunes, F., & Matos, O. (2012). Study of the epidemiology of *Pneumocystis carinii* f. sp. *suis* in abattoir swine in Portugal. *Medical Mycology*, 1–6.
- Esteves, F., Gaspar, J., De Sousa, B., Antunes, F., Mansinho, K., & Matos, O. (2011). Clinical relevance of multiple single-nucleotide polymorphisms in *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia: development of a multiplex PCR-single-base-extension methodology. *Journal of Clinical Microbiology*, 49 (5), 1810–1815.
- Esteves, F., Montes-Cano, M. A., de la Horra, C., Costa1, M. C., Calderon, E. J., Antunes, F. & Matos, O. (2008). *Pneumocystis jirovecii* multilocus genotyping profiles in patients from Portugal and Spain. *Clinical Microbiology and Infection*, 14, 356-362.
- European Centre for Disease Prevention and Control/WHO Regional Office for Europe (2011). HIV/AIDS surveillance in Europe 2010. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control.
- Gigliotti, F. (2005). *Pneumocystis carinii*: has the name really been changed? *Clinical Infectious Diseases*, 41 (12), 1752–1755.
- Goldman, A. S., Goldman, L. R., & Goldman, D. a. (2005). What caused the epidemic of *Pneumocystis pneumonia* in European premature infants in the mid-20th century? *Pediatrics*, 115 (6), 725–736.

- Hauser, P. M., Bille, J., Lass-Flörl, C., Geltner, C., Feldmesser, M., Levi, M., et al. (2011). Multicenter, prospective clinical evaluation of respiratory samples from subjects at risk for *Pneumocystis jirovecii* infection by use of a commercial real-time PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 49 (5), 1872–1878.
- Heffelfinger, J. D., Voetsch, A. C., Nakamura, G. V., Sullivan, P. S., McNaghten, A. D., & Huang, L. (2009). Nonadherence to Primary Prophylaxis against *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia. *PLoS ONE*, 4 (3), e5002.
- Helweg-Larsen, J. (2004). *Pneumocystis jirovecii*. Applied molecular microbiology, epidemiology and diagnosis. *Danish Medical Bulletin*, 51 (3), 251–273.
- Hirasawa, Y., Kohno, N., Yokoyama, a, Inoue, Y., Abe, M., & Hiwada, K. (1997). KL-6, a human MUC1 mucin, is chemotactic for human fibroblasts. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 17 (4), 501–507.
- Huang, L., Cattamanchi, A., Davis, J. L., Den Boon, S., Kovacs, J., Meshnick, et al. (2011). HIV-associated *Pneumocystis pneumonia*. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 8 (3), 294–300.
- Imai, T., Takase, M., Takeda, S., & Kougo, T. (2002). Serum KL-6 Levels in Pediatric Patients: Reference Values for Children and Levels in Pneumonia, Asthma, and Measles Patients. *Pediatric Pulmonology*, 33, 135–141
- Kohno, N., Kyoizumi, S., Awaya, Y., Fukuhara, H., Yamakido, M. & Akiyama, M. (1989). New serum indicator of interstitial pneumonitis activity. Sialylated carbohydrate antigen KL-6. *Chest*, 96, 68–73.
- Kutty, G., Hernandez-Novoa, B., Czapiga, M., & Kovacs, J. A. (2008). *Pneumocystis* encodes a functional S-adenosylmethionine synthetase gene. *Eukaryotic Cell*, 7 (2), 258–267.
- Lebron, F., Vassallo, R., Puri, V., & Limper, A. H. (2003). *Pneumocystis carinii* cell wall beta-glucans initiate macrophage inflammatory responses through NF-kappaB activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 278 (27), 25001–25008.
- Matos, O., Costa, M. C., Correia, I., Monteiro, P., Vieira, J. R., Soares, J., et al. (2006). Infecção por *Pneumocystis jirovecii* em Imunocompetentes com Patologia Pulmonar, em Portugal. *Acta Medica Portuguesa*, (19), 121–126.
- Matos, O., Costa, M., Lundgren, B., Caldeira, L., Aguiar, P., & Antunes, F. (2001). Effect of Oral Washes on the Diagnosis of *Pneumocystis carinii* Pneumonia with a Low Parasite Burden and on Detection of Organisms in Subclinical Infections. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 20 (8), 573–575.
- Matos, O., Lee, C.-H., Jin, S., Li, B., Costa, M. C., Gonçalves, L., et al. (2003). *Pneumocystis jirovecii* in Portuguese immunocompromised patients: association of specific ITS genotypes with treatment failure, bad clinical outcome and childhood. *Infection, Genetics and Evolution*, 3 (4), 281–285.

- McLauchlin, J., Amar, C., Pedraza-Díaz, S., & Nichols, G. L. (2000). Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom: results of genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1,705 fecal samples from humans and 105 fecal samples from livestock animals. *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (11), 3984–3990.
- Medrano, F. J., Montes-Cano, M., Conde, M., De La Horra, C., Respaldiza, N., Gasch, A., et al. (2005). *Pneumocystis jirovecii* in general population. *Emerging Infectious Diseases*, 11 (2), 245–250.
- Merali, S., Vargas, D., Franklin, M., & Clarkson, a B. (2000). S-adenosylmethionine and *Pneumocystis carinii*. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(20), 14958–14963.
- Morris, A., Lundgren, J. D., Masur, H., Walzer, P. D., Hanson, D. L., Frederick, T., et al. (2004). Current epidemiology of *Pneumocystis pneumonia*. *Emerging Infectious Diseases*, 10 (10), 1713–1720.
- Moukhlis, R., Boyer, J., Lacube, P., Bolognini, J., Roux, P., & Hennequin, C. (2010). Linking *Pneumocystis jirovecii* sulfamethoxazole resistance to the alleles of the DHPS gene using functional complementation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Clinical Microbiology and Infection*, 16 (5), 501–507.
- Mukherjee, P., Tinder, T. L., Basu, G. D., & Gendler, S. J. (2005). MUC1 (CD227) interacts with lck tyrosine kinase in Jurkat lymphoma cells and normal T cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 77, 90-99.
- Nahimana, A., Rabodonirina, M., Bille, J., Francioli, P., Hauser, P. M. (2004). Mutations of *Pneumocystis jirovecii* Dihydrofolate Reductase Associated with Failure of Prophylaxis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48 (11), 4301-4305.
- Nakamura, H., Tateyama, M., Tasato, D., Haranaga, S., Yara, S., Higa, F., et al. (2009). Clinical Utility of Serum  $\beta$ -D-Glucan and KL-6 Levels in *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia. *Internal Medicine*, 48 (4), 195–202.
- Ng, V. L., Yajko, D. M., McPhaul, L. W., Gartner, I., Byford, B., Goodman, C. D., et al. (1990). Evaluation of an indirect fluorescent-antibody stain for detection of *Pneumocystis carinii* in respiratory specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(5), 975–979.
- Occurrences, C., Standard, P., & Linearity, C. (2010). ELISA technical guide and protocols. *Thermo Fisher Scientific Inc.*, 0747 (815).
- Ohshimo, S., Bonella, F., Grammann, N., Starke, K., Cui, A., Bauer, P. C., et al. (2009). Serum KL-6 as a novel disease marker in adolescent and adult cystic fibrosis. *Sarcoidosis, Vasculitis, and Diffuse Lung Diseases*, 26 (1), 47–53.
- Okada, F., Ando, Y., Honda, K., Tanoue, S., Matsumoto, S., & Mori, H. (2009). Comparison of pulmonary CT findings and serum KL-6 levels in patients with cryptogenic organizing pneumonia. *The British Journal of Radiology*, 82 (975), 212–218.
- Ponce, C. A., Gallo, M., Bustamante, R., & Vargas, S. L. (2010). *Pneumocystis* colonization is highly prevalent in the autopsied lungs of the general population. *Clinical Infectious Diseases*, 50 (3), 347–353.

- Pottratz, S. T., Paulsrud, J., Smith, J. S., & Martin, W. J. (1991). *Pneumocystis carinii* attachment to cultured lung cells by *Pneumocystis* gp 120, a fibronectin binding protein. *The Journal of Clinical Investigation*, 88 (2), 403–407.
- Redhead, S. a, Cushion, M. T., Frenkel, J. K., & Stringer, J. R. (2006). *Pneumocystis* and *Trypanosoma cruzi*: nomenclature and typifications. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 53 (1), 2–11.
- Samuel, C. M., Whitelaw, A., Corcoran, C., Morrow, B., Hsiao, N.-Y., Zampoli, M., et al. (2011). Improved detection of *Pneumocystis jirovecii* in upper and lower respiratory tract specimens from children with suspected pneumocystis pneumonia using real-time PCR: a prospective study. *BioMed Central Infectious Diseases*, 11 (1), 329.
- Shigemura, M., Nasuhara, Y., Konno, S., Shimizu, C., Matsuno, K., Yamguchi, E., et al. (2012). Effects of molecular structural variants on serum Krebs von den Lungen-6 levels in sarcoidosis. *Journal of Translational Medicine*, 10, 111.
- Shimizu, Y., Sunaga, N., Dobashi, K., Fueki, M., Fueki, N., Makino, S., et al. (2009). Serum markers in interstitial pneumonia with and without *Pneumocystis jirovecii* colonization: a prospective study. *BioMed Central Infectious Diseases*, 9, 47.
- Sidhu, G. S., Cassai, N.D., Pei, Z. (2003). *Pneumocystis carinii*: An update. *Ultrastructural Pathology*, 27,115-122.
- Sing, A., Trebesius, K., Roggenkamp, A., Rüssmann, H., Tybus, K., Pfaff, F., et al. (2000). Evaluation of Diagnostic Value and Epidemiological Implications of PCR for *Pneumocystis carinii* in Different Immunosuppressed and Immunocompetent Patient Groups. *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (4):1461- 1467.
- Singhal, R., Mirdha, B. R., & Guleria, R. (2004). Human pneumocystosis. *The Indian Journal of Chest Diseases & Allied Sciences*, 47 (4), 273–283.
- Skelly, M. J., Holzman, R. S., & Merali, S. (2008). S-adenosylmethionine levels in the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with HIV infection. *Clinical infectious diseases*, 46 (3), 467–471.
- Smulian, G., Sesterhenn, T., Tanaka, R. & Cushion, M. T. (2001). The ste3 pheromone receptor gene of *Pneumocystis carinii* is surrounded by a cluster of signal transduction genes. *Genetics*, 157 (3), 991–1002.
- Song, Z., Barve, S., Chen, T., Nelson, W., Uriarte, S., Hill, D. et al. (2003). S-adenosylmethionine (AdoMet) modulates endotoxin stimulated interleukin-10 production in monocytes. *American journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 284 (6), 949–955.
- Steele, C., Marrero, L., Swain, S., Harmsen, A. G., Zheng, M., Brown, G. D., et al. (2003). Alveolar macrophage-mediated killing of *Pneumocystis carinii* f. sp. *muris* involves molecular recognition by the Dectin-1 beta-glucan receptor. *The Journal of experimental medicine*, 198 (11), 1677–1688.

- Stringer, J. R. (1996). *Pneumocystis carinii*: What Is It, Exactly? *Microbiology*, 9 (4), 489–498.
- Stringer, J. R., Beard, C. B., Miller, R. F., & Wakefield, A. E. (2002). A new name (*Pneumocystis jiroveci*) for *Pneumocystis* from humans. *Emerging Infectious Diseases*, 8 (9), 891–896.
- Tasaka, S., Hasegawa, N., Kobayashi, S., Yamada, W., Nishimura, T., Takeuchi, T., et al. (2007). Serum indicators for the diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia. *Chest*, 131 (4), 1173–1180.
- Thomas, C. F., & Limper, A. H. (2004). *Pneumocystis* pneumonia. *The New England Journal of Medicine*, 350 (24), 2487–2498.
- Wakefield, A. E. (1996). DNA sequences identical to *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii* and *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* in samples of air spora. *Journal of Clinical Microbiology*, 34, 1754-1759.
- Wakefield, A. E. (1998). Genetic heterogeneity in human-derived *Pneumocystis carinii*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 22 (1-2), 59–65.
- Wakefield, A. E. (2002). *Pneumocystis carinii*. *British Medical Bulletin*, 61, 175–188.
- Wang, J., Wright, T. W., & Gigliotti, F. (2011). Immune Modulation as Adjunctive Therapy for *Pneumocystis* pneumonia. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*, 918038.
- Watson, W. H., Zhao, Y., & Chawla, R. K. (1999). S-Adenosylmethionine attenuates the lipopolysaccharide-induced expression of the gene for tumour necrosis factor  $\alpha$ . *Society*, 25, 21–25.
- Wu, A. K., Cheng, V. C., Tang, B. S., Hung, I. F., Lee, R. A., Hui, D. S., et al. (2004). The unmasking of *Pneumocystis jiroveci* pneumonia during reversal of immunosuppression: case reports and literature review. *BioMed Central Infectious Diseases*, 4 (1), 57.