

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Diversidade microbiana e perfis de resistência antimicrobiana no trato respiratório de
pacientes com bronquiectasias

Tese de doutorado

Heryk Motta De Souza

Porto Alegre, outubro de 2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Diversidade microbiana e perfis de resistência antimicrobiana no trato respiratório de pacientes com bronquiectasias

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Heryk Motta De Souza

Orientadora: Prof. Dra. Livia Kmetzsch Rosa e Silva
Co-orientadora: Prof. Dra. Marilene Henning Vainstein

Porto Alegre, outubro de 2023

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular de Patógenos, situado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

AGRADECIMENTOS

Agradeço à UFRGS e ao PPGBCM pelo ensino de qualidade e excelência.

Agradeço à minha orientadora, Livia Kmetzsch, pelo carinho, amizade, ensinamentos, apoio e dedicação. Sem dúvida, és um exemplo a ser seguido, e fico muito feliz de ter trilhado meu caminho no meio científico contigo como guia.

À minha coorientadora Marilene Henning Vainstein, por todos os ensinamentos e apoio.

Ao professor Charley Staats, pelas ideias, ensinamentos e disponibilidade. Muito obrigado por toda a paciência que tiveste comigo durante minha jornada na bioinformática; tuas contribuições foram fundamentais.

À minha colega e amiga, Júlia Reuwsaat, por todo o conhecimento compartilhado, paciência e auxílio. Melhor dupla que alguém poderia desejar!

Às pessoas maravilhosas do 222, Ana e Andréa, muito obrigado por toda a ajuda e cumplicidade que foram necessárias.

Aos meus colegas e amigos dos Laboratórios 217, 219 e 220.

Aos meus pais e irmão, que sempre foram a base que me permitiu construir tudo o que conquistei.

Aos amigos de Porto Alegre, Esteio e Gramado, por todo o carinho e amor.

Às agências de fomento: FAPERGS, Capes e CNPq, que tornaram este trabalho possível.

Por fim, ao Neko, por todo o amor, paciência, parceria... Faltam palavras para descrever tua importância; obrigado por tudo.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES	6
LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1. FIBROSE CÍSTICA	11
1.1.1. GENE <i>CFTR</i> E A FISIOPATOLOGIA DA FIBROSE CÍSTICA	12
1.1.2. IMPACTO PULMONAR DE DEFEITOS EM <i>CFTR</i>	14
1.1.3. PATÓGENOS FREQUENTES EM FIBROSE CÍSTICA.....	14
1.1.4. MANEJO DE PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA	17
1.2. BRONQUIECTASIAS NÃO FIBROCÍSTICAS	18
1.2.1. PATÓGENOS RELEVANTES ASSOCIADOS À BRONQUIECTASIA NÃO FIBROCÍSTICA	20
1.2.2. TRATAMENTO DE BRONQUIECTASIAS NÃO FIBROCÍSTICAS.....	21
1.3. PROGRESSÃO DAS BRONQUIECTASIAS	22
1.4. MICROBIOMA PULMONAR.....	23
1.4.1. MICROBIOMA PULMONAR NA FIBROSE CÍSTICA.....	25
1.4.2. MICROBIOMA PULMONAR NAS BRONQUIECTASIAS NÃO FIBROCÍSTICAS	25
1.5. METAGENOMA NAS ABORDAGENS CLÍNICAS.....	26
2. OBJETIVOS.....	28
2.1. OBJETIVO GERAL	28
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3. MANUSCRITO	29
4. DISCUSSÃO GERAL.....	82
5. CONCLUSÕES	88
6. PERSPECTIVAS	89
7. ANEXO 1 – Manuscrito publicado junto ao periódico <i>Fungal Genetics and Biology</i>	90
8. REFERÊNCIAS.....	101
9. <i>CURRICULUM VITAE</i> RESUMIDO	109

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

CFTR	Regulador de condutância transmembrana da fibrose cística, do inglês <i>Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator</i>
GBEFC	Grupo Brasileiro de Estudo de Fibrose Cística
ABC	Transportador de cassete de ligação de ATP, do inglês <i>ATP-binding cassettransporter</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
ENaC	Canal de sódio epitelial, do inglês <i>epithelial sodium channel</i>
Na ⁺	Sódio
H ₂ O	Água
DeltaF508	Deleção da fenilalanina na posição 508 do gene <i>CFTR</i>
BCC	Complexo <i>Burkholderia cepacia</i> , do inglês <i>Burkholderia cepacia complex</i>
REBRAFC	Registro Brasileiro de Fibrose Cística
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina, do inglês <i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à meticilina, do inglês <i>Methicillin-susceptible Staphylococcus aureus</i>
HIV	vírus da imunodeficiência humana, do inglês <i>human immunodeficiency virus</i>
MNT	Micobactérias não tuberculosas
OTU	Unidade taxonômica operacional, do inglês <i>Operational Taxonomic Unit</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Potenciais etiologias das bronquiectasias não fibrocísticas	19
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A função do gene <i>CFTR</i> na regulação da viscosidade e do pH do muco.....	13
Figura 2. Prevalência de patógenos associados a quadros de fibrose cística, identificados por faixa etária no ano de 2019.....	15
Figura 3. Evolução das bronquiectasias fibrocísticas e não fibrocísticas.....	23
Figura 4. Determinantes da composição da microbiota respiratória.	24

RESUMO

As bronquiectasias são doenças caracterizadas por uma dilatação anormal e irreversível dos brônquios, resultado de danos nos tecidos pulmonares, as quais têm apresentado um significativo aumento na incidência global, tornando-se a terceira doença respiratória crônica mais frequente. Essa condição é classificada em dois grupos principais: fibrose cística e bronquiectasia não fibrocística. A progressão de ambas as doenças é mediada por um vórtice de dano vicioso, onde três fatores principais se retroalimentam: infecções recorrentes, quadro pró-inflamatório e danos teciduais pulmonares. Considerando que as infecções microbianas se relacionam com a progressão da doença, a caracterização metagenômica por *shotgun* pode auxiliar na compreensão de potenciais impactos da composição da microbiota entre os diferentes grupos, além de fornecer informações relevantes sobre o resistoma pulmonar. Neste estudo, avaliamos o microbioma e padrões de resistência antimicrobiana em amostras representativas do trato respiratório inferior e superior de pacientes diagnosticados com fibrose cística ou bronquiectasia não fibrocística, bem como de indivíduos saudáveis. Ambos os grupos de pacientes apresentaram composições microbianas e perfis de genes de resistência distintos no trato respiratório inferior quando comparados aos indivíduos saudáveis. Observamos uma redução na diversidade de espécies nos grupos patológicos, possivelmente relacionada à predominância de patógenos e ao uso crônico de antimicrobianos. Dados do trato respiratório superior evidenciaram alta similaridade no microbioma dos três grupos de estudo, destacando o potencial limitado de análises a partir de amostras de nasofaringe na triagem e decisões clínicas. A análise de abundância diferencial destacou a importância dos membros da família Burkholderiaceae na fibrose cística como um fator distintivo em relação à bronquiectasia não fibrocística. Além disso, a análise dos dados de resistoma demonstraram que o perfil de resistência entra as duas doenças apresenta clara distinção. Associado a essa diferença, o resistoma e testes de sensibilidade realizados na prática clínica se mostraram concordantes, destacando o alto potencial das análises metagenômicas na seleção de antimicrobianos. Nesse contexto, destaca-se a importância do reconhecimento das duas bronquiectasias como diferentes, tendo em vista diferenças de composição microbiana e resistoma, evitando extrapolação de condutas clínicas entre ambas.

ABSTRACT

Bronchiectasis is a condition characterized by abnormal and irreversible dilation of the bronchi, resulting from damage to lung tissues, which has shown a significant increase in global incidence, becoming the third most common chronic respiratory disease. This condition can be classified into two main groups: cystic fibrosis and non-cystic fibrosis bronchiectasis. The progression of both diseases is mediated by a vortex of vicious damage driven by three main factors: recurrent infections, inflammation triggered by the infection, and lung damage. Considering that microbial infections are related to disease progression, shotgun metagenomic characterization can help understand the potential impacts of microbiota composition between different groups, in addition to assessing relevant information about the lung resistome. In this study, we evaluated the microbiome and antimicrobial resistance patterns in representative samples from the lower and upper respiratory tracts of patients diagnosed with cystic fibrosis or non-cystic fibrosis bronchiectasis, as well as healthy individuals. Both groups of patients presented distinct microbial compositions and resistance gene profiles in the lower respiratory tract when compared to healthy individuals. We observed a reduction in species diversity in both pathological groups, possibly related to the predominance of pathogens and the chronic use of antimicrobial agents. The upper respiratory tract showed high microbiome similarity in the three studied groups, highlighting the limited potential of nasopharyngeal samples in microbial screening and clinical decisions. Differential abundance analysis underscored the importance of members of the Burkholderiaceae family in cystic fibrosis as a distinguishing factor in relation to non-cystic fibrosis bronchiectasis. Furthermore, the resistome analysis demonstrated a clear distinct resistance profile between both diseases. Associated with this difference, the comparison among the resistome and the sensitivity tests carried out in the clinical practice proved to be in agreement, emphasizing the high potential of metagenomic analyses in the selection of antimicrobials. In this context, the importance of recognizing cystic fibrosis and non-cystic fibrosis bronchiectasis as different stands out, considering differences in microbial composition and resistome, and avoiding extrapolation of clinical management between the two.

1. INTRODUÇÃO

A bronquiectasia é uma condição pulmonar crônica complexa que compromete significativamente a qualidade de vida dos pacientes e resulta em deterioração progressiva da função respiratória (SUBHAS; REES, 2022). O diagnóstico diferencial das bronquiectasias muitas vezes é tardio devido a suspeitas equivocadas, como bronquite crônica, rinossinusite crônica ou outras etiologias que causam tosse crônica (O'DONNELL, 2022).

As bronquiectasias são caracterizadas por uma dilatação anormal e irreversível dos brônquios, resultado de danos nos tecidos pulmonares. Esses danos levam a alterações estruturais, impedindo uma eficiente remoção do muco, resultando no seu acúmulo. Como resultado, a condição gera tosse crônica, produção de escarro e propensão a repetidas infecções, denominadas exacerbações (PEREIRA *et al.*, 2019). As bronquiectasias podem ser categorizadas em dois grandes grupos com base na etiologia que as desencadeia: as bronquiectasias associadas à fibrose cística e as bronquiectasias não fibrocísticas, sendo este último grupo resultante de várias doenças subjacentes (SCHÄFER *et al.*, 2018).

1.1. FIBROSE CÍSTICA

A fibrose cística é uma síndrome com impactos sistêmicos decorrentes de mutações no gene Regulador de Condutância Transmembranar de Fibrose Cística (*CFTR*, do inglês *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*), sendo considerada a mais frequente síndrome autossômica recessiva com maior mortalidade na população caucasiana (DAVIS, 2006). Estima-se que, mundialmente, a fibrose cística afete entre 1/3000 e 1/6000 indivíduos de descendência europeia (SCOTET; L'HOSTIS; FÉREC, 2020), levando a um

total de 72 mil pessoas acometidas (JACKSON; GOSS, 2018). No Brasil, dados do último relatório anual, publicado em 2020, indicavam que 6,1 mil indivíduos eram acometidos pela doença (GRUPO BRASILEIRO DE ESTUDOS DE FIBROSE CÍSTICA, 2022).

1.1.1. GENE *CFTR* E A FISIOPATOLOGIA DA FIBROSE CÍSTICA

Para a compreensão da fisiopatologia da fibrose cística, é fundamental um entendimento da função do gene *CFTR*. O gene *CFTR* codifica uma proteína da família dos transportadores ABC, formando um canal na região apical celular onde ocorre o transporte de cloreto e bicarbonato (CSANÁDY; VERGANI; GADSBY, 2019). A disfunção no transporte de cloreto é usada como critério diagnóstico, uma vez que o desbalanço na concentração do eletrólito no suor encontra-se alterada (BROWN *et al.*, 2020).

Em situações fisiológicas, na superfície das vias respiratórias há uma fina camada de hidrogel, composto por água, eletrólitos e mucinas. A associação destes componentes com a função ciliar atua na captura e remoção de potenciais patógenos e partículas inaladas (SONG; CAHN; DUNCAN, 2020). A manutenção e equilíbrio do pH desse hidrogel é, em grande parte, de responsabilidade da atividade do transportador CFTR. Em indivíduos afetados pela fibrose cística, como ilustrado de forma simplificada na Figura 1, o desequilíbrio causado por mutações no gene *CFTR* resulta em perturbações nos componentes eletrolíticos, ocasionando desequilíbrio no pH e diminuição do suprimento de água destinado à formação do muco (BERGERON; CANTIN, 2021). Dessa forma, há desidratação das mucinas que compõem o muco, aumento do pH, modificações nas propriedades reológicas do fluido e, por consequência, maior ineficácia de sua remoção (HANSSENS; DUCHATEAU; CASIMIR, 2021).

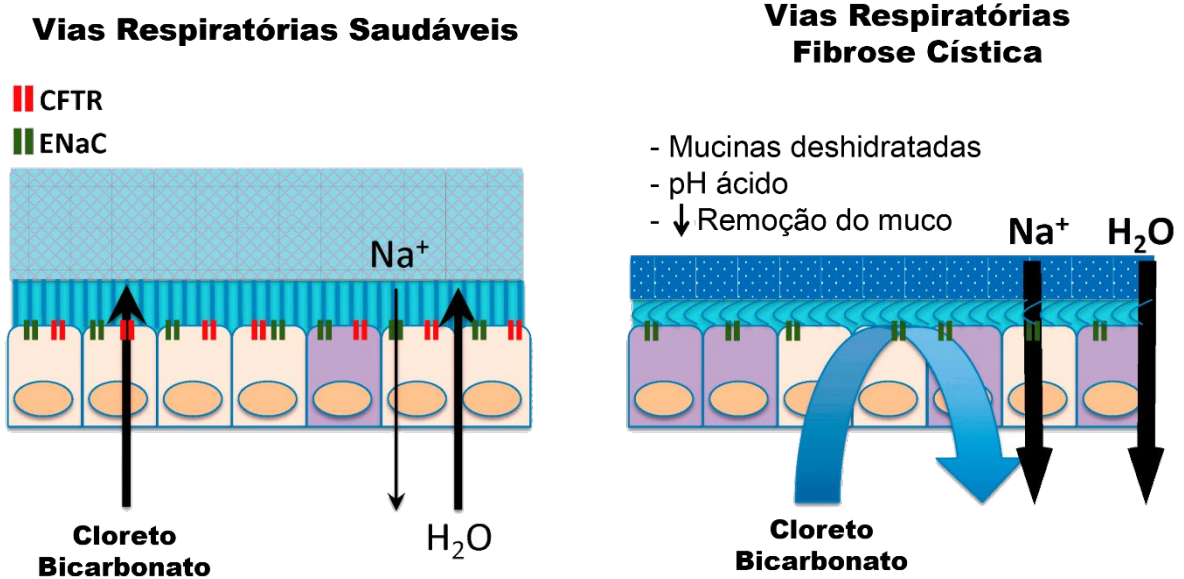


Figura 1. A função do gene *CFTR* na regulação da viscosidade e do pH do muco. A hidratação e o pH regulam a viscosidade do muco, sendo ambos geridos majoritariamente pela função do transportador CFTR localizado na superfície apical das células epiteliais. O movimento de cloreto dita o grau de água retido pelo muco, enquanto o fluxo de bicarbonato atua na definição do pH, que é crucial para uma resposta antibacteriana saudável. Devido a perda da função fisiológica do CFTR, as secreções são viscosas, aderem à superfície do tecido e obstruem estruturas cilíndricas, como pequenas vias aéreas e glândulas submucosas e incapacitando o movimento ciliar normal. Adaptado de (BERGERON; CANTIN, 2021).

A gravidade da doença correlaciona-se com o grau de perda de função do transportador CFTR, a qual relaciona-se ao tipo de mutação encontrada. Nesse contexto, as mutações no gene *CFTR* são classificadas de I a VI, relativas ao tipo de defeito, sendo eles: classe I - a ausência da proteína; classe II - defeitos de processamento e maturação; classe III - perda de função; classe IV - função reduzida; classe V – diminuição na quantidade de proteína produzida; e, por fim, classe VI - baixa estabilidade (BAREIL; BERGOUNOUX, 2020). Dentre as classes citadas as de IV a VI apresentam menor gravidade dada atividade residual da proteína. Além disso, é importante ressaltar a Classe II, uma vez que está associada à mutação DeltaF508 (deleção da fenilalanina na posição 508), que é a mutação mais prevalente em todo o mundo (BAREIL; BERGOUNOUX, 2020; BOBADILLA *et*

al., 2002). No Brasil, seguindo o padrão mundial, a mutação DeltaF508 também é a mais prevalente, representando pouco mais de metade dos genótipos encontrados nos pacientes analisados (GRUPO BRASILEIRO DE ESTUDOS DE FIBROSE CÍSTICA, 2022).

1.1.2. IMPACTO PULMONAR DE DEFEITOS EM CFTR

Ao considerarmos as implicações das alterações causadas por mutações no gene *CFTR* mencionadas anteriormente, torna-se mais claro como a função de *CFTR* afeta o sistema respiratório. Embora a disfunção de *CFTR* provoque alterações em diversos órgãos, é no sistema respiratório em que ocorrem os impactos mais significativos, os quais têm um papel crucial na mortalidade e na diminuição da qualidade de vida dos pacientes (LUKASIAK; ZAJAC, 2021).

Devido à desidratação dos fluidos que normalmente compõem o trato respiratório, juntamente com a ineficiência do movimento ciliar devido às alterações na viscosidade do muco, ocorre um acúmulo elevado do muco produzido (BERGERON; CANTIN, 2021). Associado a esses fatores, sugere-se um aumento na secreção de mucina pela formação de placas e tampões de muco endobrônquicos que se aderem ao tecido (TURCIOS, 2020). Dessa forma, origina-se um ambiente altamente favorável à proliferação de microrganismos, levando a quadros de infecção (BHAGIRATH *et al.*, 2016). Portanto, a alta proliferação de microrganismos, combinada com episódios de infecções recorrentes, resulta em um estado inflamatório crônico, que por sua vez leva a danos nos tecidos e à progressão da perda de função pulmonar (DE ROSE, 2002).

1.1.3. PATÓGENOS FREQUENTES EM FIBROSE CÍSTICA

Uma vez que a infecção é uma das principais forças motrizes relacionadas à progressão da doença, entender a relação dos patógenos mais frequentes se faz fundamental. Dentre os patógenos de maior predominância e impacto destacam-se *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, o complexo *Burkholderia cepacia* (BCC do inglês *Burkholderia cepacia complex*) e *Haemophilus influenzae* (DAVIS, 2006). Associada à alta prevalência, destaca-se o comportamento temporal desses microrganismos com a faixa etária do paciente, como demonstrado na Figura 2 (GRUPO BRASILEIRO DE ESTUDOS DE FIBROSE CÍSTICA, 2020).

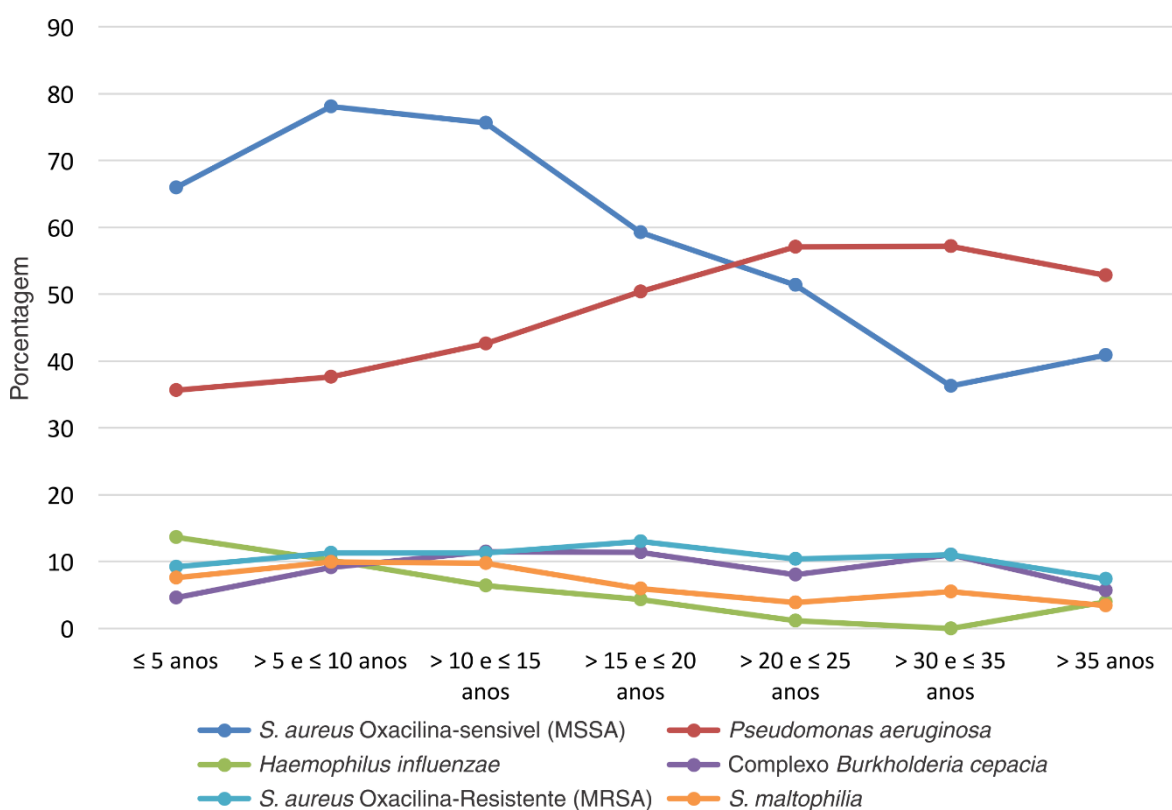


Figura 2. Prevalência de patógenos associados a quadros de fibrose cística, identificados por faixa etária no ano de 2019. Adaptado de (GRUPO BRASILEIRO DE ESTUDOS DE FIBROSE CÍSTICA, 2020).

Entre os patógenos citados anteriormente, *P. aeruginosa* é o de maior incidência e de maior contribuição para morbidade e mortalidade, apresentando índices de colonização que variam entre 30% a 75% (REYNOLDS; KOLLEF, 2021). O sucesso da colonização e infecção crônica por *P. aeruginosa* pode ser atribuído à alta capacidade adaptativa ao contexto da fibrose cística, onde a bactéria altera seus padrões fenotípicos, tornando sua infecção de difícil erradicação com consequente colonização crônica (BHAGIRATH *et al.*, 2016; WINSTANLEY; O'BRIEN; BROCKHURST, 2016).

Infecções por *S. aureus* são predominantes nos primeiros anos de vida em pacientes com fibrose cística, como demonstrado na Figura 2. Sendo componente da microbiota normal em diversos sítios, a colonização pulmonar inicial se dá por cepas que, geralmente, não apresentam cassetes de resistência (BLANCHARD; WATERS, 2019). Em idades mais avançadas, linhagens resistentes à meticilina (MRSA – do inglês *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) tendem a se tornar mais prevalentes, estando associadas à necessidade de intervenções antimicrobianas recorrentes, sendo relacionadas a uma diminuição em parâmetros de função pulmonar (REN *et al.*, 2007).

Neste contexto, o papel de *Burkholderia cepacia* possui vasta descrição, tendo uma íntima relação com declínio de função pulmonar em pacientes portadores de fibrose cística, além de importante transmissão entre indivíduos, levando ao estabelecimento de políticas de segregação de pacientes e higienização de ambientes (HAUSER *et al.*, 2011). O complexo BCC é composto por 22 espécies relacionadas, sendo responsáveis pela síndrome cepacia, uma forma aguda de pneumonia necrosante de rápida evolução (DACCÒ *et al.*, 2023; SAIMAN; SIEGEL, 2003).

Os impactos gerados pela presença de *H. influenzae* na progressão da fibrose cística possuem relações contraditórias. Dados demonstraram uma associação da colonização por *H. influenzae* e marcadores inflamatórios, porém, outros estudos demonstraram ausência de relação entre a colonização do trato respiratório inferior e redução em valores de função pulmonar (HAUSER *et al.*, 2011).

1.1.4. MANEJO DE PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA

Diretrizes clínicas para o manejo dos pacientes começam com orientações específicas para prevenir a disseminação de patógenos entre os indivíduos. Isso inclui a segregação de grupos colonizados por diferentes patógenos (seja por espaços físicos quanto diferentes datas para consulta), a constante sanitização de ambientes e mãos, o uso de máscaras e outras medidas que também foram amplamente adotadas durante a pandemia de COVID-19 (CHAPMAN; MOFFETT, 2020; SAIMAN *et al.*, 2014).

Além das medidas de prevenção de contágio, o uso de antimicrobianos é realizado com o objetivo de erradicar patógenos dominantes, como *P. aeruginosa*, visando prevenir exacerbações e, em alguns casos, devido à pura correlação clínica entre o uso de agentes antimicrobianos e a melhora da capacidade pulmonar (SHTEINBERG *et al.*, 2021). Dentre os agentes antimicrobianos mais utilizados destacam-se a tobramicina e a colistina, ambos possuindo impacto nos fatores supracitados (TACCETTI *et al.*, 2021).

Demais medidas não farmacológicas relacionadas à fisioterapia são fundamentais para o manejo dos pacientes. Exercícios respiratórios associados à nebulização de agentes mucolíticos e solução fisiológica hipertônica são grandes aliados no auxílio da remoção do muco aderido à árvore brônquica dos pacientes (SHTEINBERG *et al.*, 2021). Dessa forma,

destaca-se a importância de uma abordagem complexa associada a uma equipe multidisciplinar, para definir da melhor maneira possível o manejo do paciente (MYER; CHUPITA; JNAH, 2023).

1.2. BRONQUIECTASIAS NÃO FIBROCÍSTICAS

As bronquiectasias não fibrocísticas possuem como critério diagnóstico a apresentação das manifestações clássicas de bronquiectasia. Estas são caracterizadas pela dilatação irreversível dos brônquios associada à tosse crônica e produção aumentada de escarro (PEREIRA *et al.*, 2019). Neste contexto, ao contrário da fibrose cística, a qual possui testes diagnósticos específicos, exames de imagem tem papel fundamental associados à anamnese clínica (LEDDA *et al.*, 2021).

A incidência de bronquiectasias não fibrocísticas tem apresentado um aumento nos últimos anos, tornando-se potencialmente a terceira doença respiratória crônica mais prevalente (MARTINEZ-GARCIA; POLVERINO; AKSAMIT, 2018). Dados referentes à incidência de casos no Brasil não são bem documentados. Nos últimos estudos publicados em nível nacional, estima-se que a mortalidade decorrente de doenças respiratórias crônicas apresentaram uma redução, contrariamente ao observado em nível mundial (OLIVEIRA *et al.*, 2022). Ainda, dados de 2013 restritos ao âmbito hospitalar estimavam uma incidência de 0,9 casos de bronquiectasias por 100.000 habitantes (PEREIRA *et al.*, 2019). Dados disponibilizados pelo Ministério da Saúde referentes ao ano de 2022 apontam um total de 1,2 mil internações hospitalares, representando um custo de 2,9 milhões de reais, valor 1,6 vezes superior ao investido no valor médio por internação, assim ressaltando o alto custo e

complexidade associados ao manejo desses pacientes (MINISTÉRIO DA SAÚDE - BRASIL, [s. d.]).

Diversas doenças de base podem progredir para quadros de bronquiectasias não fibrocísticas, sendo as principais elencadas na Tabela 1. Apesar de investigações detalhadas e análises do histórico dos pacientes, a identificação da causa subjacente das bronquiectasias frequentemente resulta em um diagnóstico idiopático. Estimativas indicam que a maioria das bronquiectasias é classificada como idiopática, com prevalência variando de 26% a 53% (IMAM; DUARTE, 2020).

Tabela 1. Potenciais etiologias das bronquiectasias não fibrocísticas

Causa	Exemplos
Idiopática	
Pós-infecciosa	Pneumonia, tuberculose, infecções por <i>Mycobacterium</i> não tuberculosis, aspergilose alérgica e vírus respiratórios.
Imunodeficiências	Primária (relacionados a distúrbios hereditários), secundária (HIV, quimioterapia e uso de imunossupressores).
Doença autoimune	Doença inflamatória intestinal, doenças do tecido conjuntivo (artrite reumatoide, espondilite anquilosante e síndrome de Sjögren), sarcoidose e lúpus sistêmicos.
Síndromes hereditárias	Discinesia ciliar primária e síndrome de Marfan.
Alterações na arquitetura respiratória	Doença pulmonar obstrutiva crônica, inalação de fumaça ou toxinas, disfagia, refluxo gastroesofágico, corpo estranho e tumores

Adaptado de (MACFARLANE *et al.*, 2021).

1.2.1. PATÓGENOS RELEVANTES ASSOCIADOS À BRONQUIECTASIA NÃO FIBROCÍSTICA

Assim como na fibrose cística, as bronquiectasias não-FC apresentam patógenos intimamente relacionados à progressão da doença, onde microrganismos patogênicos levam a um quadro inflamatório e consequente deterioração pulmonar (MCDONNELL *et al.*, 2016). Avaliações da prevalência de patógenos nas bronquiectasias listam como os dois principais patógenos associados *P. aeruginosa* e *H. influenzae*, tendo relação com a frequência de exacerbações (MCDONNELL *et al.*, 2015).

Assim como na fibrose cística, *P. aeruginosa* passa por processos adaptativos que levam a um sucesso na colonização do paciente e aumento na dificuldade de sua erradicação (HILLIAM *et al.*, 2017). Sua presença pode ser utilizada como marcador de gravidade da doença, uma vez que possui relação com rápido declínio geral de função respiratória (DAVIES *et al.*, 2006).

Contrariamente ao observado na fibrose cística, *H. influenzae* também possui relação bem definida nas bronquiectasias não fibrocísticas, tendo correlação com frequência de exacerbações, comparáveis aos pacientes colonizados por *P. aeruginosa* (MCDONNELL *et al.*, 2015). Curiosamente, *P. aeruginosa* e *H. influenzae* possuem relação antagônica, onde indivíduos apresentam colonização por apenas um dos dois microrganismos, não ocorrendo coinfeção (WOO *et al.*, 2019).

Ainda, dados da população estado-unidense acometida por bronquiectasia sugerem casos de MNT (micobactérias não tuberculosas) em cerca de 63% dos indivíduos avaliados (AKSAMIT *et al.*, 2017). Infecções geradas por MNT elevam a complexidade do tratamento, uma vez que o uso de ao menos três antibióticos é recomendado além do auxílio

de profissionais com experiência na manutenção de infecções por MNT (MACFARLANE *et al.*, 2021).

1.2.2. TRATAMENTO DE BRONQUIECTASIAS NÃO FIBROCÍSTICAS

De forma análoga à fibrose cística, abordagens terapêuticas utilizadas nas bronquiectasias não fibrocísticas atuam em duas frentes principais: uso de antimicrobianos no combate de infecções e medidas de reabilitação pulmonar. Dentre abordagens não farmacológicas, a realização de fisioterapia associada ao uso de solução fisiológica hipertônica demonstraram resultados positivos no manejo de bronquiectasias não fibrocísticas (ANURADHA; GUNATHILAKA; WICKRAMASINGHE, 2021). Porém, contrário ao observado na fibrose cística, o uso de agentes mucolíticos apresenta resultados contraditórios. Dessa forma, em linha com a priorização da segurança do paciente, o consenso brasileiro de bronquiectasias acaba não recomendando a utilização de tais medidas (PEREIRA *et al.*, 2019).

O emprego de agentes antimicrobianos, assim como na fibrose cística, mostrou-se benéfico para os pacientes portadores de bronquiectasias não fibrocísticas (IMAM; DUARTE, 2020). Dentre os agentes antimicrobianos mais utilizados, destaca-se a classe dos macrolídeos, onde seu uso de forma prolongada correlaciona-se à redução no número de exacerbações (CHALMERS *et al.*, 2019). Em casos mais graves de fibrose cística, o transplante pulmonar provou ser eficaz (RAMOS *et al.*, 2019). No entanto, um estudo comparativo revelou resultados desfavoráveis quando o transplante foi realizado em pacientes com bronquiectasias não fibrocísticas, destacando a distinção entre essas duas patologias (KENNEDY *et al.*, 2022).

1.3. PROGRESSÃO DAS BRONQUIECTASIAS

A progressão das bronquiectasias está intimamente relacionada à degradação da função pulmonar, sendo a principal causa de mortalidade tanto na fibrose cística quanto na bronquiectasia não fibrocística (GIBSON; BURNS; RAMSEY, 2003; LOEBINGER *et al.*, 2009). Recomendações de acompanhamento preconizam avaliações periódicas de função respiratória através de espirometria e progressão de danos pulmonares utilizando técnicas de imagem (ATHANAZIO *et al.*, 2017; PEREIRA *et al.*, 2019). O impacto nos achados de acompanhamento dos pacientes apresentam relações com a etiologia da bronquiectasia (LOPES *et al.*, 2015). Porém, não foram encontradas evidências de que a doença de base cause alteração na mortalidade dos pacientes (LOEBINGER *et al.*, 2009).

De forma geral, a evolução das bronquiectasias fibrocísticas e não fibrocísticas são similares (AMATI *et al.*, 2019; TURCIOS, 2020). A perda progressiva de função pulmonar ocorre através de um vórtice de dano vicioso (Figura 3) (PEREIRA *et al.*, 2019). Nesse vórtice, infecções recorrentes associadas a um quadro pró-inflamatório e consequente dano tecidual acabam se retroalimentando (COLE, 1986; DE ROSE, 2002; PEREIRA *et al.*, 2019).

Lesões progressivas levam a um enrijecimento da estrutura pulmonar, associada à dilatação dos brônquios, gerando redução na capacidade respiratória (SAVIN; ZENKOVA; SEN'KOVA, 2022). O declínio de função gerado pelo processo cíclico de exacerbações e inflamação acaba levando a uma perda de função progressiva irreversível, caracterizando, assim, desfechos de falência pulmonar em ambas fibrose cística e bronquiectasia não fibrocística (CHALMERS *et al.*, 2017; SANDERS *et al.*, 2010).

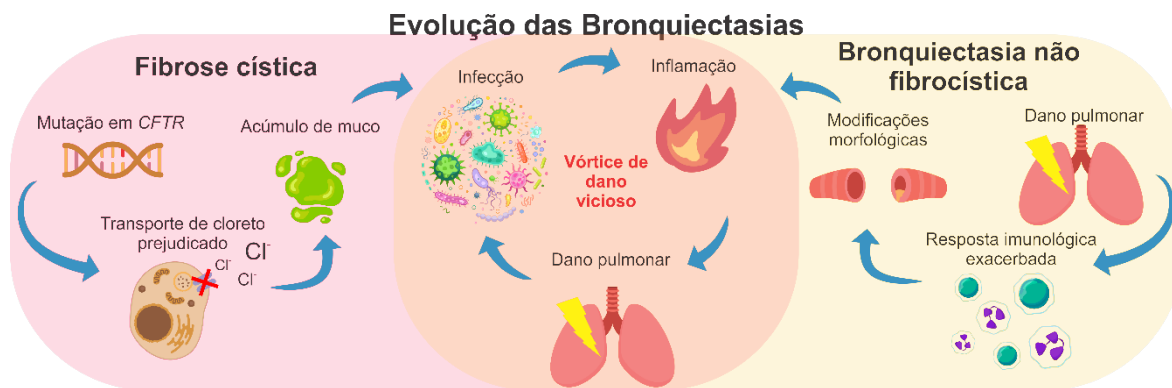


Figura 3. Evolução das bronquiectasias fibrocísticas e não fibrocísticas. As mutações no gene *CFTR* resultam em perda total ou parcial da função de seu canal de cloreto, causando comprometimento no transporte de cloreto e, conseqüentemente, aumento da reabsorção de água pelas células levando a um aumento da viscosidade do muco. Nas bronquiectasias não fibrocísticas, lesões pulmonares de variadas etiologias levam a uma resposta imunológica exacerbada, dano tecidual e conseqüentes alterações morfológicas associadas ao acúmulo de muco. Em ambas as doenças, o acúmulo de muco predispõe infecções de repetição, dando entrada ao chamado vórtice de dano vicioso, onde há uma retroalimentação cíclica entre infecção, inflamação e dano tecidual.

1.4. MICROBIOMA PULMONAR

Uma vez que o processo infeccioso é um dos principais fatores na evolução das bronquiectasias, o estudo do microbioma pulmonar se torna crucial, pois a relação entre o microbioma e desfecho da infecção desempenha um papel significativo (LIBERTUCCI; YOUNG, 2018). A microbiota pulmonar é influenciada por três fatores fundamentais que determinam sua composição (conforme esquematizado na Figura 4). O primeiro fator é a imigração, que envolve a entrada de microrganismos nos pulmões, seja pela inalação direta, microaspirações ou disseminação pelas mucosas contínuas do sistema respiratório. O segundo fator é a eliminação, que compreende processos como a depuração mucociliar, a tosse e a resposta imunológica inata e adaptativa do hospedeiro. Por fim, o terceiro fator é a capacidade de proliferação no próprio tecido pulmonar, relacionada à disponibilidade de nutrientes, tensão de oxigênio, interação com células do hospedeiro, pH e temperatura (CARNEY *et al.*, 2020; DICKSON; MARTINEZ; HUFFNAGLE, 2014).

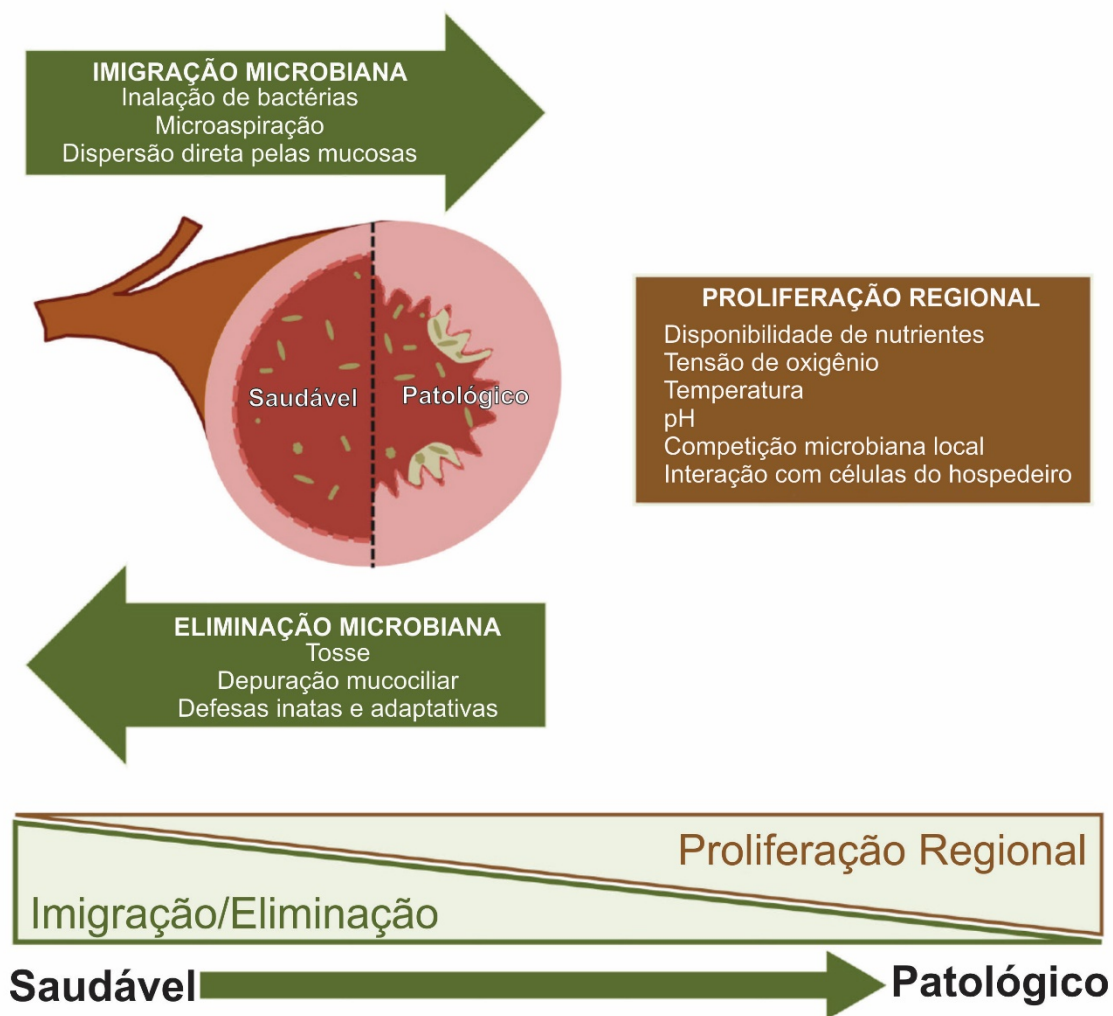


Figura 4. Determinantes da composição da microbiota respiratória. A constituição da microbiota respiratória é determinada por três fatores: imigração microbiana, eliminação microbiana e proliferação regional. Qualquer alteração detectada em estados de doença deve ser atribuída a alguma combinação desses três fatores. Em condições saudáveis, a microbiota é determinada pela imigração e eliminação; em condições patológicas a microbiota é determinada principalmente pela proliferação regional de patógenos. Adaptado de (DICKSON; MARTINEZ; HUFFNAGLE, 2014).

Associado a um predomínio de composição determinada pela imigração e eliminação de microrganismos, a microbiota pulmonar saudável apresenta uma baixa densidade de microrganismos (BASSIS *et al.*, 2015; DICKSON *et al.*, 2015). Apesar da densidade reduzida, observa-se uma elevada diversidade em composição quando comparada com condições patogênicas (FEIGELMAN *et al.*, 2017). A comunidade bacteriana é composta

majoritariamente por membros dos filos Firmicutes e Bacteroidetes, sendo os microrganismos dos gêneros *Prevotella*, *Streptococcus* e *Veillonella* os mais abundantes (PETTIGREW; TANNER; HARRIS, 2021; WHITESIDE; MCGINNISS; COLLMAN, 2021).

1.4.1. MICROBIOMA PULMONAR NA FIBROSE CÍSTICA

O primeiro impacto significativo na microbiota pulmonar de indivíduos acometidos pela fibrose cística é uma redução em sua diversidade (FEIGELMAN *et al.*, 2017). Reduções de diversidade entre indivíduos com fibrose cística possuem, ainda, uma correlação com o envelhecimento do paciente e deterioração de função pulmonar (ZEMANICK; SAGEL; HARRIS, 2011).

Quando analisamos em nível de filos, é possível observar uma redução de Fusobacteria e Bacteroidetes além de um aumento na razão Firmicutes/Bacteroidetes em pacientes acometidos por fibrose cística comparados a indivíduos saudáveis (BLAINEY *et al.*, 2012). Um enriquecimento do filo Proteobacteria também é descrito, podendo ser relacionado com a grande variedade de patógenos que o compõem (MORAN LOSADA *et al.*, 2016). Ambas as reduções de diversidade e de determinados filos possuem correlação com domínio da microbiota por patógenos clássicos da fibrose cística, reduzindo membros comensais e da microbiota aérea superiora (FRANÇOISE; HÉRY-ARNAUD, 2020; PIENKOWSKA *et al.*, 2023).

1.4.2. MICROBIOMA PULMONAR NAS BRONQUIECTASIAS NÃO FIBROCÍSTICAS

Ao contrário da frequência de estudos em fibrose cística, a literatura atual carece de dados referentes ao microbioma de pacientes com bronquiectasias não fibrocísticas (WOO *et al.*, 2019). Apesar disso, algumas relações já se encontram estabelecidas, como redução na diversidade de microrganismos, e correlação direta com a redução da função pulmonar e com a frequência exacerbação (FLUME; CHALMERS; OLIVIER, 2018; TUNNEY *et al.*, 2013).

Dentre as unidades taxonômicas operacionais (OTU) mais prevalentes na microbiota, se destacam *P. aeruginosa*, *H. influenzae* e *Streptococcus* sp., apresentando concordância com a prevalência de patógenos nessa população (COX *et al.*, 2017; WOO *et al.*, 2019). Relações entre o uso de antimicrobianos e consequente redução na abundância de OTUs e diversidade na microbiota também foram bem estabelecidos (COX *et al.*, 2017; ROGERS *et al.*, 2014; WOO *et al.*, 2019). Considerando que as exacerbações são eventos pivotais na progressão da doença, alterações no microbioma nesses momentos foram conduzidos e, surpreendentemente, o perfil encontrado demonstrou certa estabilidade de composição (MAC AOGÁIN *et al.*, 2021).

1.5. METAGENOMA NAS ABORDAGENS CLÍNICAS

Dentre os estudos de microbioma, a grande maioria se baseia em técnicas de sequenciamento de *amplicons* do gene *16S rDNA*. Apesar de dados composicionais trazerem informações relevantes para abordagens clínicas (ZHAO *et al.*, 2021), o emprego de metagenômica completa traz maior riqueza de informações associado a uma mais profunda identificação taxonômica (DURAZZI *et al.*, 2021).

Aplicações clínicas de técnicas de metagenômica têm lentamente ganhado foco como potenciais ferramentas para a prática clínica. Demonstrou-se que metagenômica apresenta alta sensibilidade na detecção de patógenos de pneumonia em amostras de trato respiratório inferior (CHEN *et al.*, 2023). Associado à identificação de patógenos, potenciais aplicações referentes à resistência a antimicrobianos é digna de destaque. Dados demonstram que ocorre uma expansão do resistoma associado ao uso de antimicrobianos, sendo essa expansão ocorrendo de forma cumulativa (FREDRIKSEN *et al.*, 2023).

Além de avaliar alterações estruturais no resistoma, pode-se estabelecer correlação direta entre dados moleculares e fenótipos encontrados em isolados clínicos (CUTHBERTSON *et al.*, 2020; LIM *et al.*, 2014). O resistoma base compartilhado por indivíduos saudáveis e com doenças respiratórias inclui genes de resistência às classes de beta-lactâmicos, diaminopirimidinas, fluoroquinolonas, macrolídeos, lincosamidas, cloranfenicol e tetraciclina (MAC AOGÁIN *et al.*, 2020).

Dessa forma, associação entre microbioma e resistoma se mostra como uma vantajosa ferramenta para uma prática clínica precisa (MAC AOGÁIN *et al.*, 2020). Ainda, há a defesa do emprego de tais técnicas para uma resposta rápida em abordagens terapêuticas (COBIÁN GÜEMES *et al.*, 2019).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar as características do microbioma pulmonar de pacientes diagnosticados com fibrose cística, pacientes com bronquiectasia não fibrocística e indivíduos saudáveis.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.2.1. Analisar a diversidade microbiana intra e intergrupos, identificando potenciais diferenças;
- 2.2.2. Investigar a composição da microbiota dos três grupos de estudo;
- 2.2.3. Analisar a abundância diferencial de microrganismos nos grupos selecionados;
- 2.2.4. Avaliar a presença e composição de genes de resistência antimicrobiana nos grupos avaliados;
- 2.2.5. Estabelecer correlações entre dados moleculares e microbiológicos relacionados à resistência antimicrobiana;
- 2.2.6. Avaliar potenciais correlações entre alterações do microbioma com dados clínicos dos pacientes avaliados.

3. MANUSCRITO SUBMETIDO À *BMC Respiratory Research*

Fator de impacto: 5.8

COMPARATIVE MICROBIOME ANALYSIS IN CYSTIC FIBROSIS AND NON-CYSTIC FIBROSIS BRONCHIECTASIS.

Heryk Motta¹, Júlia Catarina Vieira Reuwsaat¹, Fernanda Cortez Lopes^{2,3}, Graciele Viezzer⁴, Fabiana Caroline Zempulski Volpato⁵, Afonso Luís Barth⁵, Paulo de Tarso Roth Dalcin^{4,6}, Charley Christian Staats³, Marilene Henning Vainstein^{3,7,*}, Lívia Kmetzsch^{1,3,*}

¹Laboratório de Biologia Molecular de Patógenos, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

²Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

³Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

⁴Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

⁵Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

⁶Departamento de Medicina Interna, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

⁷Laboratório de Microrganismos de Importância Médica e Biotecnológica, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

*These authors share the senior authorship.

Lívia Kmetzsch, livia.kmetzsch@ufrgs.br

[Phone: +555133086077](tel:+555133086077)

4. DISCUSSÃO GERAL

O presente estudo buscou investigar e comparar o microbioma pulmonar entre os três grupos estudados: pacientes diagnosticados com fibrose cística, pacientes diagnosticados com bronquiectasia não fibrocística, e indivíduos saudáveis. A escolha dos grupos patológicos deve-se principalmente por divergirem apenas em etiologia e possuírem abordagens clínicas semelhantes, relacionadas à extrapolação de condutas da fibrose cística para bronquiectasias não fibrocísticas. Além disso, o perfil de genes de resistência foi avaliado, uma vez que no manejo de ambas as patologias ocorre o uso crônico de antimicrobianos.

A progressão tanto da fibrose cística quanto da bronquiectasia não fibrocística está intimamente ligada aos processos infecciosos. Nesse contexto, a disbiose do microbioma apresenta-se como um marcador na avaliação de infecções (AMATI *et al.*, 2019). Além de sua relação com o processo infeccioso, dados relacionados à composição da microbiota, tanto em fibrose cística quanto em bronquiectasias não fibrocísticas, foram relacionados com a progressão da doença (COX *et al.*, 2017; CUTHBERTSON *et al.*, 2020).

Como esperado, ambos grupos patológicos apresentaram uma redução em sua diversidade quando comparados com o grupo saudável, sendo essa redução relacionada a estados patológicos pulmonares e as duas doenças estudadas (CARNEY *et al.*, 2020). Esse fato pode ser associado ao predomínio da replicação e domínio de táxons patogênicos, o que acarreta em um desbalanço nos três fatores de equilíbrio da microbiota pulmonar saudável (altamente relacionada a eventos de imigração e eliminação) e ao uso exacerbado de agentes antimicrobianos (CUTHBERTSON *et al.*, 2020; DICKSON *et al.*, 2016; ZHAO *et al.*, 2012).

Quando avaliadas potenciais diferenças composicionais de espécies entre os grupos estudados, foi encontrada diferença significativa entre o grupo saudável e os grupos patológicos. Não foi encontrada uma dissimilaridade significativa na composição entre fibrose cística e bronquiectasia não fibrocística. Devido à alta frequência de *P. aeruginosa*, tanto em pacientes com fibrose cística quanto em pacientes com bronquiectasias não fibrocísticas (HILLIAM *et al.*, 2017; WINSTANLEY; O'BRIEN; BROCKHURST, 2016), e considerando que a replicação desses patógenos está associada à redução na diversidade microbiana (PIENKOWSKA *et al.*, 2023), essa associação ajuda a explicar a ausência de diferenças na diversidade microbiana (beta-diversidade) entre os grupos de pacientes com diferentes condições patológicas. Este fato corrobora achados que sugerem que a microbiota dos grupos de fibrose cística e bronquiectasia não fibrocística apresentam semelhanças (SCHÄFER *et al.*, 2018).

Quando avaliamos possíveis diferenças entre os grupos no que diz respeito ao trato respiratório superior, não encontramos diferenças significativas. Isso está de acordo com estudos anteriores que mostraram similaridades na microbiota do trato respiratório superior entre indivíduos saudáveis e aqueles afetados pela fibrose cística (PIENKOWSKA *et al.*, 2023). Portanto, é importante destacar que as diferenças observadas no trato respiratório inferior não são resultado de um desequilíbrio no trato respiratório superior. Ainda, no contexto da fisiopatologia da doença, onde alterações na reologia do muco e na morfologia pulmonar desempenham um papel fundamental na determinação da suscetibilidade à infecção (FLUME; CHALMERS; OLIVIER, 2018; MAN; DE STEENHUIJSEN PITERS; BOGAERT, 2017; SCHÄFER *et al.*, 2018), a função do nasofaringe permanece relativamente menos afetada. Consequentemente, essa preservação das condições contribui para a manutenção da composição microbiota típica.

A redução nos filos Actinobacteria, Fusobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes foi observada nos indivíduos portadores de fibrose cística quando comparados com indivíduos saudáveis. Esses dados encontram-se alinhados com o descrito para fibrose cística. Ainda, analisando especificamente os filos supracitados, dados de enriquecimento de todos eles foram demonstrados em desfechos favoráveis como formas menos graves de doenças e melhora na função pulmonar (HUANG *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2019; MORALES-GONZÁLEZ *et al.*, 2023). Dessa forma, seus enriquecimentos no grupo saudável salientam um estado fisiológico e função pulmonar adequados comparados aos grupos patológicos.

Em nosso estudo não foi possível observar uma correlação significativa entre a densidade dos filos supracitados e marcadores de função pulmonar dos pacientes nos grupos patológicos. Potencialmente o número de integrantes dos grupos estudados foi um dos limitantes no estabelecimento das correlações. Dessa forma, destaca-se a necessidade de estudos adicionais para decifrar os papéis específicos desses filos no contexto da fibrose cística e bronquiectasia não fibrocísticas.

Ao considerar espécies diferencialmente abundantes enriquecidas em ambas as comparações envolvendo o grupo saudável contra os grupos patológicos, torna-se evidente que os microrganismos enriquecidos na coorte saudável estão associados ao trato respiratório superior (FLYNN; DOOLEY, 2021; MAN; DE STEENHUIJSEN PITERS; BOGAERT, 2017; NATALINI; SINGH; SEGAL, 2023). Essa observação fortalece ainda mais a noção de que a imigração desempenha um papel predominante na formação da microbiota pulmonar no grupo saudável comparado aos grupos patológicos (CARNEY *et al.*, 2020; DICKSON *et al.*, 2016).

A presença diferencial do fago *Ackermannviridae* sp. no grupo saudável se destaca, sendo o único vírus identificado por abundância diferencial. O potencial papel de fagos no microbioma humano tem chamado atenção, considerando que são os vírus mais prevalentes nos pulmões (GREGORY *et al.*, 2018). O fago *Ackermannviridae* sp. já foi descrito como componente da microbiota intestinal, porém seu papel nos pulmões ainda não foi elucidado (BENLER *et al.*, 2021; GREGORY *et al.*, 2018; ZHANG; WANG, 2023). A presença do *Ackermannviridae* sp. pode, potencialmente, apresentar um papel positivo, uma vez que acredita-se que fagos atuam potencialmente infectando bactérias potencialmente nocivas (LAWRENCE; BALDRIDGE; HANDLEY, 2019). Estudos adicionais para investigar esse papel nos pulmões e determinar os fatores que contribuem para sua reduzida abundância na fibrose cística e bronquiectasia não fibrocística são necessários.

Nos indivíduos portadores de fibrose cística, bactérias que apresentaram abundância diferencial comparadas ao grupo saudável são majoritariamente componentes da família Burkholderiaceae, incluindo *Ralstonia* sp., *Pseudomonas*, *Xanthomonas* e BCC. Considerando que são patógenos clássicos a acometerem indivíduos com fibrose cística, esses achados corroboram dados prévios (FRANÇOISE; HÉRY-ARNAUD, 2020; GREEN; JONES, 2015; MAHENTHIRALINGAM; URBAN; GOLDBERG, 2005; PRIOR; GUNARATNAM; HUMPHREYS, 2017). De forma similar, a comparação entre bronquiectasia não fibrocística e o grupo saudável apresentou abundância diferencial de *P. aeruginosa*, patógeno clássico da condição que tende a dominar a microbiota e relaciona-se com desfechos desfavoráveis (CHALMERS *et al.*, 2023; COX *et al.*, 2017; WOO *et al.*, 2019).

Ao compararmos os dois grupos patológicos encontramos membros do grupo BCC enriquecido nos indivíduos acometidos por fibrose cística. Esse achado é o diferencial entre

os dois grupos estudados. Uma maior susceptibilidade a componentes do BCC por portadores de fibrose cística pode ser relacionada a fatores que se estendem além das alterações pulmonares. Componentes do BCC mostraram evadir a eliminação ao subverter mecanismos de autofagia pós fagocitose (FLORES-VEGA *et al.*, 2021). As mutações no gene *CFTR* levam a uma maior suscetibilidade a esse mecanismo, resultando na perpetuação da infecção em pacientes com fibrose cística, enquanto indivíduos com bronquiectasia não fibrocística, apesar de terem uma maior susceptibilidade por alterações fisiológicas no pulmão, ainda apresentam uma conservação do processo de eliminação de patógenos fagocitados (ABDULRAHMAN *et al.*, 2011).

Em comparação, membros do grupo de bronquiectasia não fibrocística apresentaram, apenas, *Prevotella shahii* diferencialmente abundante quando comparados à fibrose cística. Esse achado sugere certa conservação nos mecanismos de imigração de componentes da microbiota do trato respiratório superior. Em comparações entre subgrupos de portadores de fibrose cística que apresentavam fenótipo de rápida deterioração de função pulmonar contra aqueles que não apresentavam, o grupo que conservava função pulmonar tinha uma maior prevalência de membros da microbiota saudável (ACOSTA *et al.*, 2018). Esse achado nos permite traçar um paralelo entre os resultados obtidos, levantando a hipótese de que, potencialmente, portadores de bronquiectasia não fibrocística apresentam melhor prognóstico pulmonar quando comparados aos acometidos por fibrose cística.

Ao analisarmos dados referentes à composição e frequência de genes de resistência dos três grupos de estudo nas amostras de escarro, os indivíduos saudáveis e com bronquiectasia não fibrocística apresentaram uma menor incidência de genes de resistência em comparação com o grupo acometido por fibrose cística. Dado que ambas as doenças envolvem abordagens clínicas comparáveis para administração de antimicrobianos (TAY;

REID; BELL, 2015), destaca-se o fato de bronquiectasia não fibrocística não apresentar níveis comparáveis a fibrose cística na presença de genes de resistência.

A aplicação potencial de dados metagenômicos para ajuste de condutas clínicas já foi enfatizada anteriormente considerando dados de resistência (LIM *et al.*, 2014) e composicionais da microbiota (ROGERS *et al.*, 2014). Nossos dados reforçam ainda mais esse potencial, demonstrando uma clara relação entre resistoma e teste de sensibilidade a antimicrobianos. Dessa forma, enfatizando o uso de resistoma como ferramenta de decisões clínicas rápidas (COBIÁN GÜEMES *et al.*, 2019).

Considerando os resultados apresentados, sugere-se que a fibrose cística e a bronquiectasia não fibrocística requerem abordagens clínicas distintas. Embora compartilhem semelhanças, são notáveis diferenças na composição e incidência de determinados componentes da microbiota como componentes do BCC e nos perfis de genes de resistência antimicrobiana, destacam a necessidade de estratégias diferenciadas para cada uma das doenças. Nossos dados demonstram claramente uma forte correlação entre os dados do resistoma e observações práticas, destacando o potencial das abordagens moleculares no direcionamento da terapêutico.

5. CONCLUSÕES

- 5.1. Pacientes portadores de fibrose cística e bronquiectasia não fibrocística apresentam redução na diversidade alfa em comparação com indivíduos saudáveis;
- 5.2. Indivíduos portadores de fibrose cística demonstram maior dissimilaridade microbiana entre si do que indivíduos com bronquiectasia não fibrocística e indivíduos saudáveis;
- 5.3. Dados composicionais de nasofaringe não apresentam diferenças significativas entre os grupos, mostrando pouco potencial de emprego como sítio de triagem ou avaliação de potenciais marcadores;
- 5.4. Componentes do BCC associados a um aumento da razão F/B desempenham um papel fundamental na diferenciação entre pacientes com fibrose cística e bronquiectasia não fibrocística;
- 5.5. O resistoma de indivíduos afetados por fibrose cística, bronquiectasia não fibrocística e indivíduos saudáveis apresenta diferenças entre os grupos;
- 5.6. Pacientes com fibrose cística exibem um maior número de cópias de genes de resistência em comparação com pacientes com bronquiectasia não fibrocística e indivíduos saudáveis;
- 5.7. Dados moleculares do resistoma são consistentes com dados de resistência provenientes testes de sensibilidade a antimicrobianos, destacando o potencial do uso do metagenoma na orientação das condutas clínicas.

6. PERSPECTIVAS

- 6.1. Avaliação de vias de virulência pelo emprego do VFDB (*Virulence Factors Database*) no intuito de identificar genes de virulência e avaliar potenciais diferenças entre os grupos estudados;
- 6.2. Avaliação de redes de interação entre os microrganismos presentes nos diferentes grupos estudados – pelo uso do pacote SPIEC-EASI na plataforma R;
- 6.3. Avaliação de interação polimicrobianas *in vitro* e análise de fatores de virulência de microrganismos isolados e em co-cultivo.

7. ANEXO 1 – Manuscrito publicado junto ao periódico *Fungal Genetics and Biology*

Durante a fase inicial do doutorado foram realizados experimentos determinantes para a publicação do artigo em anexo. Dentre os ensaios realizados, destacam-se a caracterização do mutante para o gene parálogo *HPS12.2* e o duplo mutante de *Cryptococcus gattii*.

Nesse trabalho foram caracterizados dois genes codificantes de Hsp12 (*HSP12.1* e *HSP12.2*) de *C. gattii*, uma proteína de choque térmico pequena. Através de minuciosa avaliação verificamos que *HSP12.1* possui papel na estabilização da membrana plasmática e sua deleção leva a um acúmulo de espécies reativas de oxigênio associado a uma mudança nos padrões de expressão de genes de resposta ao estresse oxidativo. Ainda, sua deleção afetou a taxa de fagocitose por macrófagos murinos e redução de virulência em modelo invertebrado. Ao avaliarmos o parálogo *HSP12.2*, não foi possível encontrar diferenças fenotípicas. Associado ao fato que o duplo mutante para ambos os genes levou a uma reprodução dos fenótipos encontrados para *HSP12.1* sugerimos que ocorreu uma perda de função em *HSP12.2*.

The small heat shock protein Hsp12.1 has a major role in the stress response and virulence of *Cryptococcus gattii*.

Heryk Motta^a, Júlia Catarina Vieira Reuwsaat^a, Eamim Daidrê Squizani^a, Matheus da Silva Camargo^a, Ane Wichine Acosta Garcia^a, Augusto Schrank^{a,b}, Marilene Henning Vainstein^{a,b}, Charley Christian Staats^{a,b}, Lívia Kmetzsch^{a,b,*}

^aCentro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^bDepartamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

*liviak@cbiot.ufrgs.br.



The small heat shock protein Hsp12.1 has a major role in the stress response and virulence of *Cryptococcus gattii*

Heryk Motta^a, Júlia Catarina Vieira Reuwsaat^a, Eamim Daidrê Squizani^a,
Matheus da Silva Camargo^a, Ane Wichine Acosta Garcia^a, Augusto Schrank^{a,b},
Marilene Henning Vainstein^{a,b}, Charley Christian Staats^{a,b}, Livia Kmetzsch^{a,b,*}

^a Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^b Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Cryptococcus gattii
Heat shock protein
Hsp12
Plasma membrane
Oxidative stress

ABSTRACT

Cryptococcus gattii is one of the etiological agents of cryptococcosis. To achieve a successful infection, *C. gattii* cells must overcome the inhospitable host environment and deal with the highly specialized immune system and poor nutrients availability. Inside the host, *C. gattii* uses a diversified set of tools to maintain homeostasis and establish infection, such as the expression of remarkable and diverse heat shock proteins (Hsps). Grouped by molecular weight, little is known about the Hsp12 subset in pathogenic fungi. In this study, the function of the *C. gattii* *HSP12.1* and *HSP12.2* genes was characterized. Both genes were upregulated during murine infection and heat shock. The *hsp12.1* Δ null mutant cells were sensitive to plasma membrane and oxidative stressors. Moreover, *HSP12* deletion induced *C. gattii* reactive oxygen species (ROS) accumulation associated with a differential expression pattern of oxidative stress-responsive genes compared to the wild type strain. Apart from these findings, the deletion of the paralog gene *HSP12.2* did not lead to any detectable phenotype. Additionally, the double-deletion mutant strain *hsp12.1* Δ /*hsp12.2* Δ presented a similar phenotype to the single-deletion mutant *hsp12.1* Δ , suggesting a minor participation of Hsp12.2 in these processes. Furthermore, *HSP12.1* disruption remarkably affected *C. gattii* virulence and phagocytosis by macrophages in an invertebrate model of infection, demonstrating its importance for *C. gattii* pathogenicity.

1. Introduction

Cryptococcus neoformans and *Cryptococcus gattii* are basidiomycete yeasts and the etiological agents of cryptococcosis. *C. neoformans* mainly affects immunocompromised hosts and is predominantly associated with human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients, while *C. gattii* infections prevail in immunocompetent hosts (Kwon-Chung et al., 2016; Lin and Heitman, 2006). Around 280,000 cases of cryptococcosis are estimated annually, with a variable, country-dependent mortality range (Rajasingham et al., 2017). This infection can be acquired by the inhalation of basidiospores or dissected yeast cells. After colonizing the lungs, fungal cells can disseminate through the bloodstream to the central nervous system (CNS), frequently causing lethal meningitis (Perfect, 2005).

In the lungs, cryptococcal cells must deal with a hostile environment

and highly specialized immune system. The success of infection relies on the production of virulence determinants, such as the assembly of a polysaccharide capsule with immunomodulatory properties, the secretion of extracellular enzymes, biofilm formation, melanin production, and thermotolerance (Kwon-Chung et al., 2000; May et al., 2016). Along with these virulence determinants, cryptococcal homeostasis mechanisms are also required for yeast cell responses to stressors. The heat shock proteins (Hsps) are key components of the stress response and participate in a wide range of biological processes such as ubiquitination, membrane stabilization, and protein folding (Tiwari et al., 2015).

Hsps are usually categorized by molecular mass (Jee, 2016). Some proteins from the Hsp70 family have already been described as being recognized by serum from *C. neoformans*-infected mice and modulating the host immune response (Eastman et al., 2015; Kakeya et al., 1997; Silveira et al., 2013). Hsp90 also has an important role in *Cryptococcus*

* Corresponding author at: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia, Avenida Bento Gonçalves, 9500 – Bloco IV, Prédio 43421, Lab. 222, Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail address: livia.kmetzsch@ufrgs.br (L. Kmetzsch).

<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2023.103780>

Received 8 August 2022; Received in revised form 9 November 2022; Accepted 8 February 2023

Available online 11 February 2023

1087-1845/© 2023 Elsevier Inc. All rights reserved.

virulence. Hsp90 is localized to the *C. neoformans* surface and acts as an ATPase, regulating capsule formation and resistance to echinocandins (Chatterjee and Tatu, 2017). Additionally, the chemical inhibition of Hsp90 in *C. neoformans* and *C. gattii* led to higher sensitivity to antifungal drugs and alterations in capsule thickness and virulence in a *C. elegans* model of infection (Cordeiro et al., 2016).

Hsp12 is another Hsp that is conserved among different fungi. In *Saccharomyces cerevisiae*, Hsp12 interacts with lipids and stabilizes the plasma membrane, acting as a lipid chaperone (Herbert et al., 2012). *Candida albicans* has two copies of Hsp12 coding genes, both regulated by the cyclic adenosine monophosphate (cAMP) signaling cascade (Fu et al., 2012; Sheth et al., 2008). *C. neoformans* also has two Hsp12 coding genes; while disruption of a single gene leads to higher sensitivity to the antifungal drug amphotericin B (AmpB), double disruption further increases AmpB sensitivity, suggesting a redundant function for both Hsp12s (Maeng et al., 2010).

In the present work, we characterized the function of the two Hsp12 coding genes (*HSP12.1* and *HSP12.2*) from *C. gattii*. We demonstrated that disruption of the Hsp12.1 coding gene leads to higher sensitivity to oxidative and membrane stressors, a higher rate of phagocytosis by macrophages, and decreased virulence in the *Tenebrio molitor* model of infection. Additionally, disruption of the Hsp12.2 coding gene does not lead to any detectable phenotypic changes, while the double deletion strain behaves similarly to the *hsp12.1* null mutant.

2. Materials and methods

2.1. Fungal strains, plasmids, primers, and media

The *C. gattii* R265 strain used in this study was kindly provided by Wieland Meyer (University of Sydney, Australia). The plasmid pDNORNAT containing the nourseothricin marker cassette was previously constructed by our group (de Oliveira Schneider et al., 2012). The plasmid pJAF15 containing the hygromycin resistance marker cassette was kindly provided by Joseph Heitman (Duke University, Durham, NC, USA). The sequences of the primers used in the study are listed in Table S1. For all experiments, *C. gattii* strains were grown in yeast extract–peptone–dextrose (YPD) medium (1 % [wt/vol] yeast extract, 2 % [wt/vol] peptone, and 2 % [wt/vol] dextrose) overnight at 30 °C with shaking at 200 rpm. For solid plates, YPD agar (YPD medium, 1.5 % [wt/vol] agar) was used. YPD plates containing nourseothricin (100 µg/ml) were used to select for the *HSP12.1*-deleted strain (*hsp12.1Δ*), while YPD plates containing hygromycin (200 µg/ml) were used to select for the *HSP12.1*-complemented strain (*hsp12.1 Δ::HSP12.1*) and *HSP12.2*-deleted strain (*hsp12.2Δ*). YPD plates containing a mix of nourseothricin and hygromycin were used to select for the double deletion strain *hsp12.1Δ/hsp12.2Δ*.

2.2. Strain construction

To construct the *hsp12.1Δ* null strain, the DelsGate method was employed (García-Pedrajas et al., 2008). *HSP12.1* flanking sequences (1 kb upstream and 1 kb downstream of the coding gene sequence, CNBG_2441) were PCR-amplified and gel-purified using the PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kits (Invitrogen™, Waltham, MA, US). The plasmid pDNOR-NAT and purified PCR products were mixed in equimolar amounts in a Gateway BP clonase™ II reaction (Invitrogen™, Waltham, MA, US). The pDNOR-NAT-HSP12.1 construct was linearized by I-SceI digestion prior to biolistic transformation into *C. gattii* R265 cells (Toffaletti et al., 1993).

For *HSP12.1* complementation, the coding region along with the same 1 kb upstream and downstream gene flanking regions (CNBG_2441) were amplified by PCR. The gel-purified PCR fragments were subcloned into the *EcoRV* site of the pJAF15 plasmid. The pJAF15-*HSP12.1* plasmid was linearized with *NotI* and transformed into the *hsp12.1Δ* strain as described above. To construct the *hsp12.2Δ* and

hsp12.1Δ/hsp12.2Δ strains, the split-marker strategy was employed (Jung et al., 2018). The 5' and 3' flanking regions of the *HSP12.2* coding sequence were PCR-amplified (961 pb and 957 pb, respectively, CNBG_5853) and fused by double-joint PCR with the hygromycin resistance marker. Equimolar quantities of the purified PCR products were used to transform the *C. gattii* R265 and *hsp12.1Δ* strains by biolistics. The constructed strains were confirmed by RT-PCR expression analysis (Fig. S1).

2.3. Gene expression analyses

For the heat shock expression assay, R265 cells were cultured overnight in YPD at 30 °C and 200 rpm. The cells were then washed with phosphate-buffered saline (PBS), and 1×10^7 cells/mL were inoculated in Erlenmeyer flasks containing Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) High Glucose (Gibco™, Waltham, MA, US) for 2 h at 30 °C and 200 rpm. The control groups were maintained under the same conditions, while the heat shock conditions comprised incubation at 39 °C and 200 rpm for 10, 20, and 40 min. After each time point, cells were collected, washed with PBS, and frozen with liquid nitrogen and stored at – 80 °C until RNA extraction.

For the oxidative stress gene expression assay, cells of each cryptococcal strain were cultured overnight in YPD as described above. Cells were washed with PBS, and 2.5×10^4 cells/mL were incubated in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium (Gibco™, Waltham, MA, US) supplemented or not with 3 mM of paraquat for 24 h at 30 °C under static conditions, in biological triplicates. Cells were then collected, washed with PBS, and frozen with liquid nitrogen and stored at – 80 °C until RNA extraction.

RNA extraction was performed with TRIzol™ (Invitrogen, Waltham, MA, US) reagent following the manufacturer's protocol. Total extracted RNA was treated with RQ1 RNase-Free Dnase (Promega™, Madison, WI, US) and the reverse transcriptase reaction was performed with ImProm-II reverse transcriptase (Promega™, Madison, WI, US) using oligo-dT primers. Quantitative PCR (qPCR) analyses were performed using the Fast 7500 real-time PCR system from Applied Biosystems™ using PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Invitrogen™, Waltham, MA, US) with 8 ng of cDNA. Each cDNA sample was analyzed in triplicate for each primer pair. Melting curve analysis was performed at the end of each reaction to confirm a single PCR product. Actin was used as the reference gene. Relative expression was determined by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak and Schmittgen, 2001).

2.4. Paraquat resistance

C. gattii cells were cultivated overnight in YPD and washed with PBS, following which 10^7 cells were cultivated in RPMI medium in the presence or absence of 3 mM paraquat in 96-well plates at 30 °C for 24 h. Next, cells were washed with PBS and plated on YPD solid medium. The plates were incubated at 30 °C for 48 h and colony forming unit (CFU) was determined. Paraquat resistance was determined as the percentage of viable cells in the presence of paraquat compared to cells cultivated in its absence.

2.5. Phenotypic characterization assays

C. gattii strains were cultivated overnight in YPD as described, washed with PBS, and counted using a Neubauer chamber. Then, 10-fold serial dilutions ranging from 1×10^7 to 1×10^3 cells/ml were prepared. A volume of 3 µL of each dilution was plated in BD Difco™ Yeast Nitrogen Base (YNB) (BD, Franklin Lakes, NJ, US) agar plates supplemented with the following stressors: saline (NaCl 1.5 M), osmotic (sorbitol 2 M), cell wall (calcofluor white 300 µg/mL and Congo Red 5 mg/mL), plasma membrane (sodium dodecyl sulfate (SDS) 0.005 %), oxidative (hydrogen peroxide 2.5 mM), and the antifungal drugs fluconazole (5 µg/mL) and amphotericin B (1 µg/mL). Plates were

incubated at 30 °C for 2 days and photographed.

Capsule size was determined in capsule inducing conditions as previously described and final measurements were presented as *capsule thickness = total cell diameter – cell body diameter* (Reuwsaat et al., 2021). To induce melanin production, a PBS cell suspension containing 4×10^6 cryptococcal cells/mL was incubated at 30 °C in minimal medium supplemented with 1 mM of L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) for 96 h, protected from light in a 12-well plate (Reuwsaat et al., 2018). The cell-free supernatant absorbance was determined at 400 nm using the Molecular Devices SpectraMax® i3x (San Jose, CA, US). To evaluate the deposition of melanin on the cryptococcal cell surface, the same medium described above supplemented with 1.5 % agar was used, and 3 μ L of a 1×10^7 cells/mL suspension was plated. After 48 h of incubation at 30 °C, cell melanization was evaluated and photographed.

2.6. Heat shock viability assay

C. gattii strains were exposed to heat shock under the same conditions described in the gene expression analyses (section 2.3). Cells were then diluted and plated on YPD plates for survival determination. After 48 h of incubation at 30 °C, the CFU of each strain was accessed.

2.7. Intracellular ROS determination

C. gattii cells were cultivated overnight in YPD and washed with PBS, and 1×10^7 cells were kept under agitation at 30, 37 or 39 °C for 1 h in PBS. Next, the cells were resuspended in 10 μ M Sigma™ 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DFCH-DA) in PBS and incubated for 1 h at 37 °C or 39 °C with agitation. Cells were resuspended in PBS and analyzed with the Guava easyCyte flow cytometer (Merck Millipore) by measuring the green fluorescence of 5000 events.

2.8. Macrophage and virulence assays

C. gattii strains were cultivated in YPD and washed with PBS, following which 1×10^6 cryptococcal cells opsonized with anti-glucuronoxylomannan (GXM) 18B7 antibody (1 μ g/mL at 37 °C for 1 h) were added to macrophage-containing plates. The 96-well macrophage culture plates were prepared by seeding 1×10^5 J774A.1 cells/well and activating them overnight with recombinant murine interferon gamma (IFN- γ) (100 U/ml, Sigma™) and *Escherichia coli* lipopolysaccharides (500 ng/ml, Sigma™). Macrophage-*Cryptococcus* containing plates were incubated at 37 °C under 5 % CO₂. After 2 h, each well was washed three times with warm PBS to remove non-internalized *C. gattii* cells. Macrophages were lysed by the addition of cold 0.1 % Triton X-100

ultrapure water solution and plated on YPD medium. YPD plates were incubated at 30 °C for 48 h and CFU was determined. The virulence of each *C. gattii* strain was determined in the *T. molitor* model of infection as described previously by inoculating a total of 10^6 cells of each cryptococcal strain per larva and incubating at 37 °C (de Souza et al., 2015).

3. Results

3.1. HSP12 expression is induced during mouse infection and heat shock

Previously published transcriptomic data from our group were analyzed in order to select potential targets related to *C. gattii* virulence (Ferrareze et al., 2017). In the published study of *C. gattii* R265 cells recovered from murine bronchoalveolar lavage, we performed a comparative analysis of the fragments per kilobase of exon per million mapped fragments (FPKM) values of both *HSP12* genes (*HSP12.1* and *HSP12.2*) with the housekeeping gene actin (*ACT1*). *HSP12.1* and *HSP12.2* were the genes with the fourth and fifth highest FPKM values, respectively, while actin was in the 252nd position, indicating the high expression of the *HSP12* genes and their potential importance for *C. gattii* pathogenicity (Fig. 1A).

Considering the usual increase in the expression of Hsps after heat shock exposure, a condition that could be found during infection, the transcript levels of both *HSP12* genes were evaluated in a time course of 10, 20, and 40 min following a temperature shift from 30 °C to 39 °C. As expected, the expression of both *C. gattii* *HSP12* genes increased temporally after the heat shock stimulus (Fig. 1B). To evaluate if these genes were necessary for survival of cryptococcal cells during heat shock, null mutants were generated for each gene (*hsp12.1 Δ and *hsp12.2 Δ), as well as double mutant (*hsp12.1 Δ /*hsp12.2 Δ), along with restored complementation mutants for the *HSP12.1* gene (*hsp12.1 Δ ::*HSP12.1*). Despite the induced transcription of both genes, the absence of *HSP12.1* (*hsp12.1 Δ strain), *HSP12.2* (*hsp12.2 Δ strain) or both (*hsp12.1 Δ /*hsp12.2 Δ strain) did not impair *C. gattii* cell viability after heat shock (Fig. S2).*********

3.2. HSP12.1 deletion leads to higher sensitivity to the plasma membrane and oxidative stressors SDS and hydrogen peroxide.

As orthologs of Hsp12 are associated with the survival of fungal cells to several types of stress (Sales et al., 2000; Sheth et al., 2008), we sought to determine the potential role of Hsp12.1 and Hsp12.2 proteins in *C. gattii* stress survival, using a serial dilution spot plate assay under different conditions. Compared to WT, the *hsp12.1 Δ and *hsp12.1 Δ /*hsp12.2 Δ mutants showed a drastic growth reduction in the presence of***

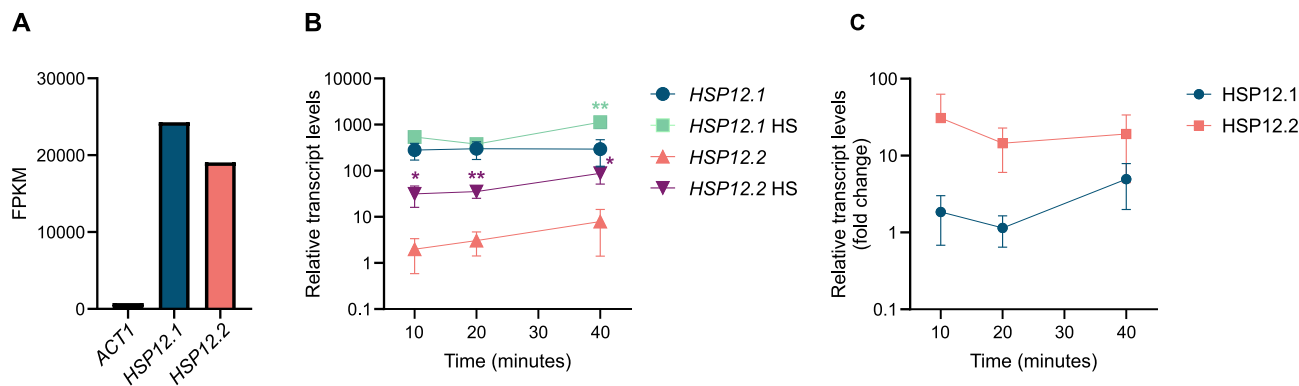


Fig. 1. *HSP12.1* and *HSP12.2* expression is increased during infection and after heat shock. (A) FPKM values from the RNA sequencing of *C. gattii* R265 cells recovered from murine bronchoalveolar lavage 24 h post infection (Ferrareze et al., 2017). FPKM, fragments per kilobase per million. (B) Time-course expression analysis of *HSP12* genes after switching from 30 °C to a 39 °C heat shock (HS) condition for 10, 20, and 40 min. Data are presented as the mean \pm standard deviation of three experimental replicates with three biological replicates. The asterisks denote statistically significant differences between the transcript levels of *HSP12.1* or *HSP12.2* and the corresponding HS condition. Comparisons to WT were analyzed by unpaired *t*-test, where * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, and *** $P \leq 0.001$. (C) Fold change in time-course gene expression of *HSP12.1* or *HSP12.2* in HS condition for 10, 20, and 40 min.

the plasma membrane stressor SDS. In addition, a slight growth reduction was observed for the *hsp12.1Δ* mutant in the presence of hydrogen peroxide. However, the *hsp12.2Δ* growth was comparable to that of the wild type (WT) (Fig. 2 and Fig. S3). All strains grew equally in the presence of osmotic stressors (sorbitol and sodium chloride), cell wall stressors (Congo red and calcofluor white), and the antifungal drugs amphotericin B and fluconazole, which target the plasma membrane (Fig. 2). Collectively, these results suggest that Hsp12.1 may be involved in plasma membrane homeostasis and oxidative metabolism.

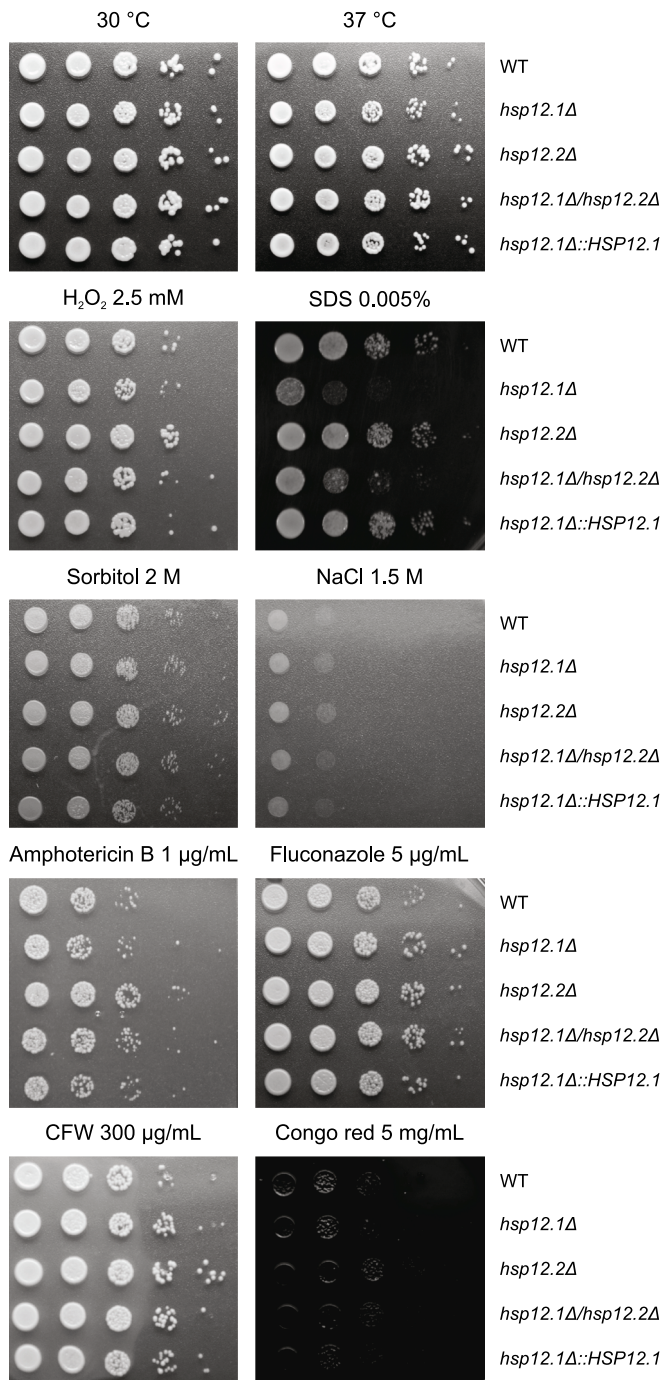


Fig. 2. *HSP12.1* disruption leads to higher susceptibility to plasma membrane and oxidative stressors. Serial dilution assay was performed by plating 3 μ L of 10-fold serially diluted suspensions of each strain in YNB agar supplemented with hydrogen peroxide, SDS, NaCl, sorbitol, Congo red, calcofluor white, amphotericin B, and fluconazole at the indicated concentrations. YNB plates were incubated at 30 $^{\circ}$ C for 48 h.

3.3. The absence of *HSP12.1* affects the *C. Gattii* response to oxidative stress

Due to the sensitivity of the *hsp12.1Δ* and *hsp12.1Δ/hsp12.2Δ* strains to hydrogen peroxide, intracellular ROS was determined by flow cytometry to evaluate if *HSP12.1* absence impacts the redox status of *C. gattii* cells. Both *hsp12.1Δ* and *hsp12.1Δ/hsp12.2Δ* strains showed an accumulation of intracellular ROS compared to the WT and *hsp12.2Δ* strains when incubated at 37 $^{\circ}$ C (Fig. 3A) and 39 $^{\circ}$ C (Fig. 3B) and when subjected to a temperature switch from 30 $^{\circ}$ C to 39 $^{\circ}$ C (Fig. 3C). Additionally, as melanin has a fundamental role in free-radical cell protection (Casadevall et al., 2000), melanin secretion and cell melanization were evaluated in the WT and mutant strains. However, no differences were observed (Fig. S4).

To further investigate the strains' behavior in response to oxidative stress, we cultivated *C. gattii* WT and mutant cells in the presence of 3 mM of paraquat, a redox-cycling molecule that induces the production of free radicals as superoxide (O_2^-) (Halliwell and Gutteridge, 2015). Unexpectedly, *hsp12.1Δ* and *hsp12.1Δ/hsp12.2Δ* were even more resistant to paraquat compared to WT (Fig. 4).

Due to the paradoxical behavior of sensitivity to hydrogen peroxide and tolerance for paraquat, the expression of oxidative stress response-related genes was determined in the cells cultured under the same conditions as the previous assay. Comprising the main response pathways to oxidative stress, the following genes were selected for analysis: superoxide dismutase 1 and 2 (*SOD1* and *SOD2*), which catalyze the dismutation of the superoxide anion into hydrogen peroxide and molecular oxygen (Dias et al., 2006); catalase 1, 2, and 3 (*CAT1*, *CAT2*, and *CAT3*), which catalyze the degradation of hydrogen peroxide into oxygen and water (Giles et al., 2006); glutathione peroxidase 1 and 2 (*GPX1* and *GPX2*), which contribute to the detoxification of hydrogen peroxide and lipid hydroperoxides by the consumption of glutathione (Missall et al., 2005); and peroxiredoxin Q (*DOT5*) and thiol-specific antioxidant 3 (*TSA3*), both of which act together in the oxidation of a thiol group to detoxify reactive species (Upadhyaya et al., 2013).

In the absence of paraquat, no statistically significant difference in the relative transcript levels of each gene could be found between the strains (Fig. 5). Additionally, when cultivated in the presence of paraquat, a complex pattern of regulation was found. It is worth noting that the null strains that had a resistance phenotype to the drug also displayed higher expression of oxidative stress defense genes such as *GPX1* and *TSA3* when compared to WT and *hsp12.2Δ* (Fig. 5). In addition, *CAT2* and *SOD1* were also upregulated in *hsp12.1Δ/hsp12.2Δ* and *hsp12.1Δ* compared to WT and *hsp12.2Δ* (Fig. 5), which displayed a phenotype comparable with that of the WT (Fig. 4). No significant differences were found for the genes *GPX2*, *SOD2*, *DOT5*, and *CAT3* (Fig. 5).

Taken together, these results suggest that Hsp12.1 may be involved in the adaptation of cryptococcal cells to oxidate stress by the expression modulation of genes that code ROS-metabolizing enzymes.

3.4. *HSP12.1* knockout alters *C. Gattii* phagocytosis and virulence

As alveolar macrophages are the first-line defense against cryptococcal infection and expose such cells to a stress milieu (Esher et al., 2018), the phagocytosis index of each strain was evaluated. INF- γ - and lipopolysaccharide (LPS)-activated J774A.1 macrophages displayed a higher uptake of *hsp12.1Δ* cells compared to the WT and other mutant cells (Fig. 6A). To evaluate the possible cause of phagocytosis index alteration by *HSP12.1* disruption, the capsule size was determined. The capsule thickness of the *hsp12.1Δ* (16.28 μ m) and *hsp12.1Δ/hsp12.2Δ* (15.63 μ m) strains was slightly increased compared to the WT (12.62 μ m), *hsp12.2Δ* (12.99 μ m), and *hsp12.1Δ::HSP12.1* (13.53 μ m) strains (Fig. S5), which would impact the association with phagocytes.

To confirm that *HSP12* gene disruption alters *C. gattii* virulence as suggested by the macrophage interaction assay, an invertebrate model (*Tenebrio molitor* larvae) of cryptococcosis were used to access the

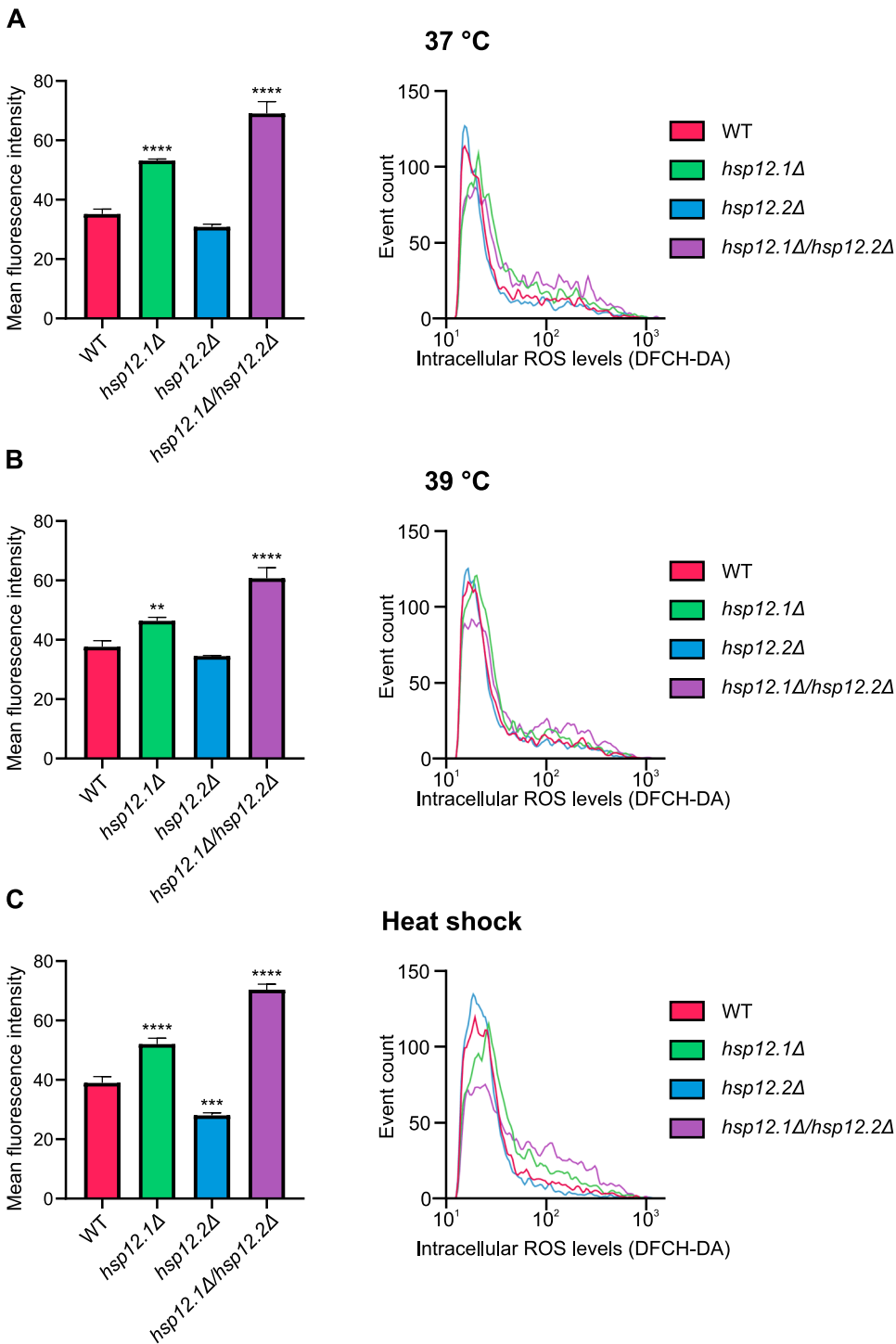


Fig. 3. Deletion of *HSP12.1* leads to intracellular ROS accumulation. Intracellular ROS levels were evaluated by flow cytometry of DFCH-DA-stained cells. Cells were incubated for 1 h at 37 °C (A), 39 °C (B) or 30 °C (C) in PBS. Next, the cells were stained with 10 μ M DFCH-DA in PBS for 1 h at 37 °C (A) or 39 °C (B, C). The measurements represent the mean fluorescence intensity of the samples and the distribution of marked cells. Data are presented as mean \pm standard deviation. Comparisons to WT were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's multiple comparison test. **** $p < 0.0001$, *** $p = 0.0002$, and, ** $p = 0.0029$.

virulence of WT and each mutant. The absence of *HSP12.1* led a hypovirulent phenotype, as larvae infected with such mutants survived more compared to other genotypes. However, the virulence of the *hsp12.1Δ/hsp12.2Δ* double mutant was not altered (Fig. 6B), suggesting compensatory mechanisms associated with the absence of both Hsp12 coding genes.

4. Discussion

Hsps are a family of proteins with highly diversified mechanisms of action (Tiwari et al., 2015) that are extremely conserved from yeasts to

humans (Burnie et al., 2006). Despite the vast amount of data available on Hsps, little is known about Hsp12 and its function in pathogenic fungi. In the present work, we showed that the expression of *HSP12.1* and *HSP12.2* genes is induced after heat shock, which is consistent with the behavior of *HSP12* orthologs in *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, and *C. albicans* (Ahn et al., 2012; Fu et al., 2012; Praekelt and Meacock, 1990). *HSP12* expression is linked to the high osmolarity glycerol (HOG)–mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in *C. albicans* (Fu et al., 2012; Sheth et al., 2008), while in *C. neoformans*, the transcription of *HSP12* genes was related to the cAMP, RAS, and HOG signaling pathways (Bahn and Jung, 2013; Maeng et al., 2010). All

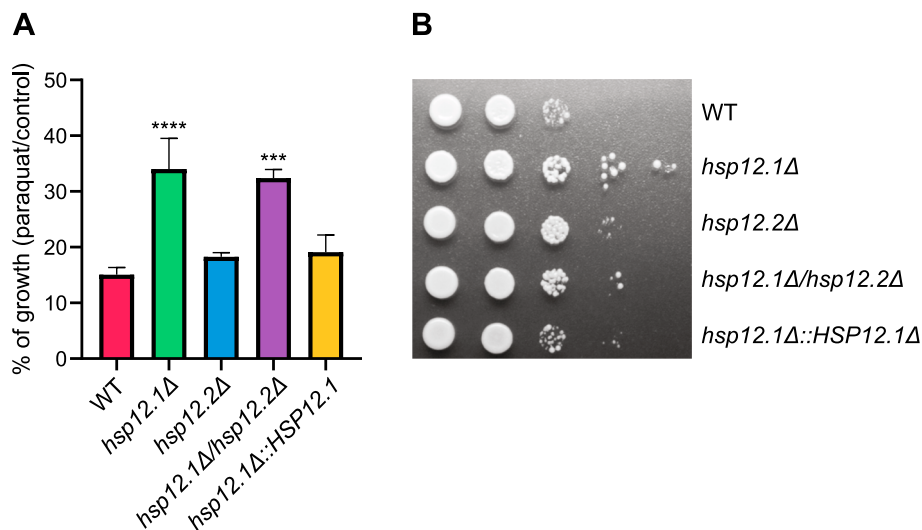


Fig. 4. The *hsp12.1Δ* strain is resistant to paraquat. (A) Cell viability was analyzed by the ratio of the CFU of cells exposed to 3 mM of paraquat to the CFU in the absence of the drug. Comparisons to WT were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's multiple comparison test. **** $p < 0.0001$ and *** $p = 0.0001$ (B) Spot assay was performed in YNB supplemented with 1 mM paraquat. The plate was incubated at 30 °C for 48 h and photographed.

these signaling pathways are activated by multiple environmental stress conditions, such as heat shock stimulus and at the host site of infection (Bahn and Jung, 2013; Pentland et al., 2018; Rourke et al., 2002).

The link between Hsp12 and viability after heat shock has already been established in *S. cerevisiae* (Welker et al., 2010). In *C. gattii*, despite its active transcription, heat shock did not affect the null mutant strain's viability. *C. gattii* *HSP12.1* disruption led to sensitivity to the cell membrane stressor SDS. The function of Hsp12 from *S. cerevisiae* and *C. albicans* is linked to plasma membrane stabilization (Fu et al., 2012; Herbert et al., 2012; Sales et al., 2000; Welker et al., 2010). Additionally, the extensively studied *S. cerevisiae* Hsp12 is only active when associated to the plasma membrane, where it gains its alpha helix structure in association with long-chain fatty acid phospholipids (Herbert et al., 2012). *HSP12* deletion in those studies led to phenotypes similar to those seen in *C. gattii*, suggesting that *S. cerevisiae* and *C. albicans* Hsp12.1 function is conserved in *C. gattii* (Fu et al., 2012; Maeng et al., 2010; Singarapu et al., 2011).

Higher sensitivity to hydrogen peroxide was also associated with a higher intracellular levels of ROS accumulation in the null strains *hsp12.1Δ* and *hsp12.1Δ/hsp12.2Δ* when compared to the WT and *hsp12.2Δ* strains. This redox imbalance notwithstanding, the *HSP12.1* null strains did not present any defect in melanin/melanization, which is intimately linked with oxidative stress management (Dadachova et al., 2007; Wang et al., 1995). Moreover, the *hsp12.1Δ* and *hsp12.1Δ/hsp12.2Δ* strains were resistant to paraquat. Despite the paradoxical character of resistance to the increased production of superoxide anions associated with sensitivity to hydrogen peroxide, it is important to emphasize that the response elicited during oxidative stress is specific to each type of stressor (Delaunay et al., 2000).

The expression of genes with central roles in the oxidative stress response was evaluated, and none of them presented any difference between the mutant and WT strains in media without the addition of oxidative stressors. When evaluated in the presence of paraquat, *GPX1* and *TSA3* were induced in the resistant strains *hsp12.1Δ* and *hsp12.1Δ/hsp12.2Δ*. Both genes are related to the reduction of hydrogen peroxide and other organic hydroperoxides (Halliwell and Gutteridge, 2015). In *C. neoformans*, *GPX1* was found to be repressed when cells were exposed to hydrogen peroxide and induced in cells exposed to *t*-butylhydroperoxide and cumene hydroperoxide, two organic hydroperoxides, as well as associated with a higher sensitivity to both stressors in a null strain compared to WT (Missall et al., 2005). *TSA3* was induced when *C. neoformans* cells were exposed to hydrogen peroxide but a *TSA3* null

strain did not lead to higher sensitivity to hydrogen peroxide or other organic hydroperoxide stressors (Missall et al., 2004). Higher expression of both *TSA3* and *GPX1* in *C. gattii* correlates directly with a proper fitness in paraquat and may be related to the accumulation of ROS in the *hsp12.1Δ* and *hsp12.1Δ/hsp12.2Δ* strains when compared with WT and *hsp12.2Δ*.

Superoxide dismutase activity is responsible for detoxifying superoxide and producing hydrogen peroxide and molecular oxygen and is important for *Cryptococcus* virulence (Cox et al., 2003). *SOD1* gene expression was induced only in the *hsp12.1Δ/hsp12.2Δ* strain, probably due to ROS accumulation, and may be responsible for the virulence rescue when compared to the *hsp12.1Δ* strain.

The catalase gene family of *C. neoformans* has already been characterized. Null strains for each of the *CAT* genes did not display any detectable phenotype and virulence alteration (Giles et al., 2006). The upregulation of the *CAT2* gene in the *hsp12.1Δ* strain may indicate a different mechanism of dealing with stress when compared to the double null mutant since both had a similar behavior phenotypically but differed in the macrophage and infection assays.

Superoxide also had a protective function in *S. cerevisiae* when yeast cells were exposed to hydrogen peroxide (Thorpe et al., 2013). This phenomenon may be responsible for *hsp12.1Δ* and *hsp12.1Δ/hsp12.2Δ* sensitivity to hydrogen peroxide and resistance to superoxide. As we have observed, *hsp12.1Δ* and *hsp12.1Δ/hsp12.2Δ* intracellular ROS accumulation may lead to higher metabolism of superoxide, causing superoxide depletion in the cell. This way, *hsp12.1Δ* and *hsp12.1Δ/hsp12.2Δ* can have poor outcomes when exposed to hydrogen peroxide and a resistant phenotype in the presence of a superoxide production inducer such as paraquat.

HSP12.1-disrupted cells displayed higher rates of phagocytosis compared to WT and reconstituted cells; this is probably unrelated to capsule thickness, as capsule size was mildly higher in *hsp12.1Δ* and *hsp12.1Δ/hsp12.2Δ* when compared to the control strains. Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) are recognized by pattern recognition receptors (PRRs) in macrophages. Structural alterations in the cell surface can promote PAMPs' "camouflage" (Campuzano and Wormley, 2018; Erwig and Gow, 2016). As the *S. cerevisiae* *HSP12* null strain had altered morphology after exposure to stress conditions, our first hypothesis is that alterations in the cell surface due to *HSP12.1* disruption caused the cells to be more easily recognized by macrophages (Welker et al., 2010). The *HSP12.1* gene was also required to promote cryptococcal virulence. Plasma membrane sensitivity and impaired

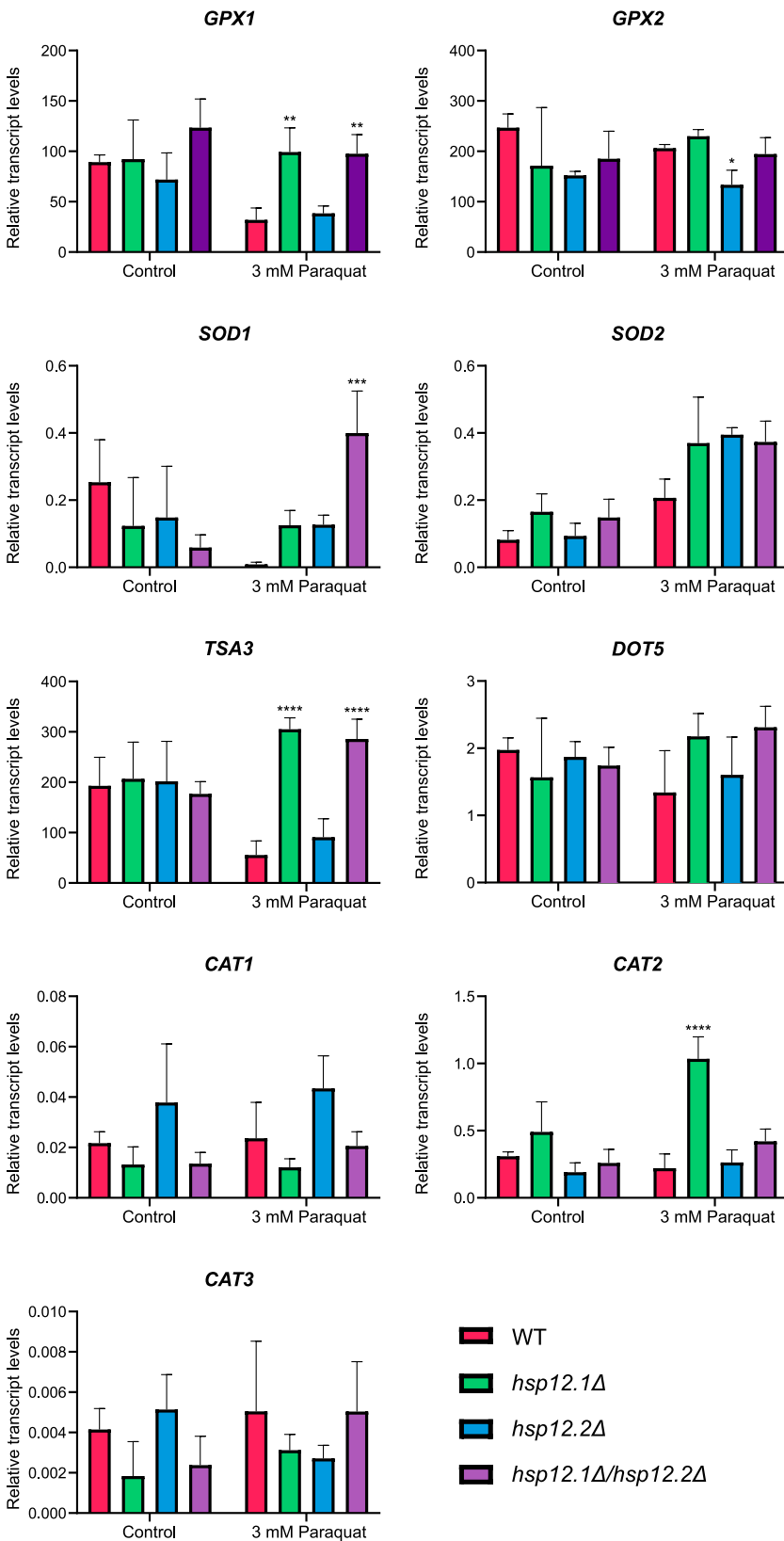


Fig. 5. Absence of *HSP12* leads to altered expression of redox homeostasis coding genes under paraquat stress. The relative expression of each indicated gene was measured by RT-qPCR of cells cultivated in RPMI medium with or without supplementation with 3 mM paraquat. Data are presented as the mean of biological triplicates \pm standard deviation. The relative expression was measured using the *ACT1* gene as the normalizer. Comparisons to WT were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's multiple comparison test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and, $p < 0.0001$.

redox balance are remarkable features of the *hsp12.1Δ* and *hsp12.1Δ/hsp12.2Δ* strains. The decreased virulence of *hsp12.1Δ* might be linked to its abnormal phenotypes. *T. molitor* immune response, as well as those of more complex organisms, is dependent on PAMPs recognition and phagocytic cells. The release of cytotoxic reactive oxygen and nitrogen

species is also a strategy used by *T. molitor* during infection (Vigneron et al., 2019). In contrast to these findings, the double mutant did not lose its virulence like the *HSP12.1* null strain when compared to the WT strain. The fact that *hsp12.1Δ/hsp12.2Δ* undergoes less phagocytosis by macrophages compared to *hsp12.1Δ* may be pivotal for this virulence

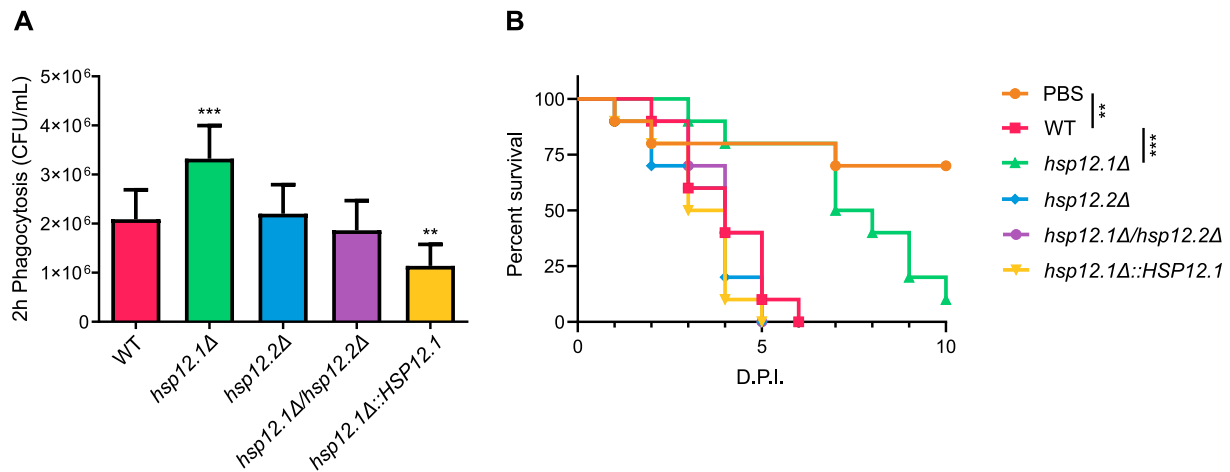


Fig. 6. *HSP12.1* disruption impairs *C. gattii* phagocytosis susceptibility and virulence. (A) Cryptococcal cells opsonized with anti-GXM 18B7 antibody were cultivated in an MOI of 10:1 in the presence of J774A.1 murine macrophages. After 2 h of interaction, macrophages were washed with PBS to remove non-internalized *C. gattii* cells, lysed, and plated on YPD medium. Comparisons to WT were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's multiple comparison test. ** $p = 0.005$ and *** $p = 0.0003$. (B) *T. molitor* larvae weighing between 100 and 200 mg were inoculated with the evaluated strains. The larvae were incubated at 30 °C in Petri dishes and the number of dead larvae was recorded in intervals of 24 h over 10 days. The median number of survival days was 4 (WT), 7.5 (*hsp12.1Δ*), 3.5 (*hsp12.1Δ::HSP12.1*), 4 (*hsp12.2Δ*), and 4 (*hsp12.1Δ/hsp12.2Δ*). Statistical differences were determined using a Mantel – Cox log-rank test. WT-PBS, ** $p = 0.0019$, WT- *hsp12.1Δ*, *** $p = 0.0005$.

phenotype, possibly by compensatory effects driven by the absence of both paralogs. However, this hypothesis remains to be elucidated.

Here, we characterized both *HSP12* genes of *C. gattii*, showing that *HSP12.1* is linked to plasma membrane stabilization. *HSP12.1* absence leads to redox status impairment and a hypovirulent phenotype in an invertebrate model of infection. *HSP12.2* appears to have no function in the conditions tested in our study, as the *hsp12.2Δ* null strain does not show phenotypic alterations and the double deletion mutant reproduces the *HSP12.1*-linked phenotype.

Declarations of Interest.
none.

CRediT authorship contribution statement

Heryk Motta: Conceptualization, Investigation, Validation, Formal analysis, Writing – original draft. **Júlia Catarina Vieira Reuwsaat:** Investigation, Formal analysis, Writing – review & editing. **Eamim Daidrê Squizani:** Investigation. **Matheus da Silva Camargo:** Investigation. **Ane Wichine Acosta Garcia:** Investigation. **Augusto Schrank:** Supervision, Resources, Funding acquisition. **Marilene Henning Vainstein:** Supervision, Resources, Funding acquisition. **Charley Christian Staats:** Supervision, Writing – review & editing. **Lívia Kmetzsch:** Conceptualization, Supervision, Writing – review & editing, Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

We thank Wieland Meyer for providing the *C. gattii* R265 strain, Joseph Heitman for providing the plasmid pJAF15, and Arturo Casadevall for providing the anti-GXM 18b7 antibody. This work was supported by grants from the Brazilian funding agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; grant number 312797/2021-4) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). HM, JCVR, EDS, MSC, and AWAG were recipients of CAPES scholarships.

References

- Ahn, J., Won, M., Choi, J.H., Kyun, M.L., Cho, H.S., Park, H.M., Kang, C.M., Chung, K.S., 2012. Small heat-shock protein Hsp9 has dual functions in stress adaptation and stress-induced G2-M checkpoint regulation via Cdc25 inactivation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 417, 613–618. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.12.017>.
- Bahn, Y.S., Jung, K.W., 2013. Stress signaling pathways for the pathogenicity of *Cryptococcus*. *Eukaryot. Cell* 12, 1564–1577. <https://doi.org/10.1128/EC.00218-13>.
- Burnie, J.P., Carter, T.L., Hodgetts, S.J., Matthews, R.C., 2006. Fungal heat-shock proteins in human disease. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 53–88. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2005.00001.x>.
- Campuzano, A., Wormley, F.L., 2018. Innate immunity against *Cryptococcus*, from recognition to elimination. *J. Fungi* 4. <https://doi.org/10.3390/jof4010033>.
- Casadevall, A., Rosas, A.L., Nosanchuk, J.D., 2000. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 354–358. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00103-X](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00103-X).
- Chatterjee, S., Tatu, U., 2017. Heat shock protein 90 localizes to the surface and augments virulence factors of *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11, 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005836>.
- Cordeiro, R. de A., Evangelista, A.J. de J., Serpa, R., de Farias Marques, F.J., de Melo, C. V.S., de Oliveira, J.S., da Silva Franco, J., de Alencar, L.P., de Jesus Pinheiro Gomes Bandeira, T., Brilhante, R.S.N., Sidrim, J.J.C., Rocha, M.F.G., 2016. Inhibition of heat-shock protein 90 enhances the susceptibility to antifungals and reduces the virulence of *Cryptococcus neoformans*/ *Cryptococcus gattii* species complex. *Microbiol. (United Kingdom)* 162, 309–317. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000222>.
- Cox, G.M., Harrison, T.S., McDade, H.C., Taborada, C.P., Heinrich, G., Casadevall, A., Perfect, J.R., 2003. Superoxide Dismutase Influences the Virulence of *Cryptococcus neoformans* by Affecting Growth within Macrophages. *Infect. Immun.* 71, 173–180. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.1.173>.
- Dadachova, E., Bryan, R.A., Huang, X., Moedel, T., Schweitzer, A.D., Aisen, P., Nosanchuk, J.D., Casadevall, A., 2007. Ionizing Radiation Changes the Electronic Properties of Melanin and Enhances the Growth of Melanized Fungi. *PLoS One* 2, e457.
- de Oliveira Schneider, R., de Souza Süffert Fogaça, N., Kmetzsch, L., Schrank, A., Vainstein, M.H., Staats, C.C., 2012. Zap1 regulates zinc homeostasis and modulates virulence in *Cryptococcus gattii*. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043773>.
- de Souza, P.C., Morey, A.T., Castanheira, G.M., Bocate, K.P., Panagio, L.A., Ito, F.A., Furlaneto, M.C., Yamada-Ogatta, S.F., Costa, I.N., Mora-Montes, H.M., Almeida, R.S., 2015. *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) as an alternative host to study fungal infections. *J. Microbiol. Methods* 118, 182–186. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.10.004>.
- Delanay, A., Isnard, A.D., Toledano, M.B., 2000. H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *EMBO J.* 19. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.19.5157>.
- Dias, A.L.T., Brigagão, M.R.P.L., Colepicolo, P., Squeira, A.M., Da Silva, E.G., Paula, C.R., 2006. Superoxide dismutase in *Cryptococcus neoformans* varieties *gattii*, *grubii*, and *neoformans*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762006000100021>.
- Eastman, A.J., He, X., Qiu, Y., Davis, M.J., Vedula, P., Lyons, D.M., Park, Y.-D., Hardison, S.E., Malachowski, A.N., Osterholzer, J.J., Wormley, F.L., Williamson, P. R., Olszewski, M.A., 2015. Cryptococcal Heat Shock Protein 70 Homolog *Ssa1* Contributes to Pulmonary Expansion of *Cryptococcus neoformans* during the Afferent

- Phase of the Immune Response by Promoting Macrophage M2 Polarization. *J. Immunol.* 194, 5999–6010. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402719>.
- Erwig, L.P., Gow, N.A.R., 2016. Interactions of fungal pathogens with phagocytes. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 163–176. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2015.21>.
- Esher, S.K., Zaragoza, O., Alspaugh, J.A., 2018. Cryptococcal pathogenic mechanisms: A dangerous trip from the environment to the brain. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 113, 1–15. <https://doi.org/10.1590/0074-02760180057>.
- Ferrarezze, P.A.G., Streit, R.S.A., dos Santos, P.R., dos Santos, F.M., de Almeida, R.M.C., Schrank, A., Kmetzsch, L., Vainstein, M.H., Staats, C.C., 2017. Transcriptional Analysis Allows Genome Reannotation and Reveals that *Cryptococcus gattii* VGII Undergoes Nutrient Restriction during Infection. *Microorganisms* 5, 49. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5030049>.
- Fu, M.S., de Sordi, L., Mühlshlegel, F.A., 2012. Functional characterization of the small heat shock protein Hsp12p from *Candida albicans*. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042894>.
- García-Pedrajas, M.D., Nadal, M., Kapa, L.B., Perlin, M.H., Andrews, D.L., Gold, S.E., 2008. DelsGate, a robust and rapid gene deletion construction method. *Fungal Genet. Biol.* 45, 379–388. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2007.11.001>.
- Giles, S.S., Stajich, J.E., Nichols, C., Gerrald, Q.D., Alspaugh, J.A., Dietrich, F., Perfect, J.R., 2006. The *Cryptococcus neoformans* catalase gene family and its role in antioxidant defense. *Eukaryot. Cell* 5, 1447–1459. <https://doi.org/10.1128/EC.00098-06>.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2015. Free Radicals in Biology and Medicine, Fifth edition, Free Radicals in Biology and Medicine. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001>.
- Herbert, A.P., Riesen, M., Bloxam, L., Kosmidou, E., Wareing, B.M., Johnson, J.R., Phelan, M.M., Pennington, S.R., Lian, L.Y., Morgan, A., 2012. NMR structure of Hsp12, a protein induced by and required for dietary restriction-induced lifespan extension in yeast. *PLoS One* 7, 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041975>.
- Jee, H., 2016. Size dependent classification of heat shock proteins: a mini-review. *J. Exerc. Rehabil.* 12, 255–259. <https://doi.org/10.12965/jer.1632642.321>.
- Jung, K.W., Lee, K.T., So, Y.S., Bahn, Y.S., 2018. Genetic Manipulation of *Cryptococcus neoformans*. *Curr. Protoc. Microbiol.* 50, 1–32. <https://doi.org/10.1002/cpmc.59>.
- Kakeya, H., Udono, H., Ikuno, N., Yamamoto, Y., Mitsutake, K., Miyazaki, T., Tomono, K., Koga, H., Tashiro, T., Nakayama, E., Kohno, S., 1997. A 77-kilodalton protein of *Cryptococcus neoformans*, a member of the heat shock protein 70 family, is a major antigen detected in the sera of mice with pulmonary cryptococcosis. *Infect. Immun.* 65, 1653–1658.
- Kwon-chung, K.J., Fraser, J.A., Doering, T.L., Wang, Z.A., Janbon, G., Idnurm, A., Bahn, Y., 2016. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the Etiologic Agents of Cryptococcosis. *Cold Spring Harb. Perspect.* 1–28. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019760>.
- Fraser, J. A., Doering, T. L., Wang, Z., Janbon, G., Idnurm, A., et al. (2014). *Cold Spring Harb Perspect. Med.* 4:a019760. doi: 10.1101/cshperspect.a019760.
- Kwon-Chung, K.J., Sorrell, T.C., Dromer, F., Fung, E., Levitz, S.M., 2000. Cryptococcosis: Clinical and biological aspects. *Med. Mycol.* 38, 205–213. <https://doi.org/10.1080/mmy.38.s1.205.213>.
- Lin, X., Heitman, J., 2006. The Biology of the *Cryptococcus neoformans* Species Complex. *Annu. Rev. Microbiol.* 60, 69–105. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.60.080805.142102>.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Maeng, S., Ko, Y.J., Kim, G.B., Jung, K.W., Floyd, A., Heitman, J., Bahn, Y.S., 2010. Comparative transcriptome analysis reveals novel roles of the ras and cyclic AMP signaling pathways in environmental stress response and antifungal drug sensitivity in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot. Cell* 9, 360–378. <https://doi.org/10.1128/EC.00309-09>.
- May, R.C., Stone, N.R.H., Wiesner, D.L., Bicanic, T., Nielsen, K., 2016. *Cryptococcus*: From environmental saprophyte to global pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2015.6>.
- Missall, T.A., Pusateri, M.E., Lodge, J.K., 2004. Thiol peroxidase is critical for virulence and resistance to nitric oxide and peroxide in the fungal pathogen. *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.* 51 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.03921.x>.
- Missall, T.A., Cherry-Harris, J.F., Lodge, J.K., 2005. Two glutathione peroxidases in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* are expressed in the presence of specific substrates. *Microbiology* 151. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28132-0>.
- Pentland, D.R., Piper-brown, E., Mühlshlegel, F.A., Gourlay, C.W., 2018. Ras signalling in pathogenic yeasts. *Microb. Cell* 5, 63–74. <https://doi.org/10.15698/mic2018.02.612>.
- Perfect, J.R., 2005. *Cryptococcus neoformans*: A sugar-coated killer with designer genes. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 45, 395–404. <https://doi.org/10.1016/j.femsim.2005.06.005>.
- Praekelt, U.M., Meacock, P.A., 1990. HSP12, a new small heat shock gene of *Saccharomyces cerevisiae*: Analysis of structure, regulation and function. *MGG Mol. Gen. Genet.* 223, 97–106. <https://doi.org/10.1007/BF00315801>.
- Rajasingham, R., Smith, R.M., Park, B.J., Jarvis, J.N., Govender, N.P., Chiller, T.M., Denning, D.W., Loyse, A., Boulware, D.R., 2017. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *Lancet Infect. Dis.* 17, 873–881. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30243-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30243-8).
- Reuwsaat, J.C.V., Agustinho, D.P., Motta, H., Chang, A.L., Brown, H., Brent, M.R., Kmetzsch, L., Doering, T.L., 2021. The transcription factor pdr802 regulates titan cell formation and pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *MBio* 12. <https://doi.org/10.1128/mBio.03457-20>.
- Reuwsaat, J.C.V., Motta, H., Garcia, A.W.A., Vasconcelos, C.B., Marques, B.M., Oliveira, N.K., Rodrigues, J., Ferrarezze, P.A.G., Frases, S., Lopes, W., Barcellos, V.A., Squizani, E.D., Horta, J.A., Schrank, A., Rodrigues, M.L., Staats, C.C., Vainstein, M.H., Kmetzsch, L., 2018. A Predicted Mannoprotein Participates in *Cryptococcus gattii* Capsular Structure. *mSphere* 3. <https://doi.org/10.1128/msphere.00023-18>.
- Rourke, S.M.O., Herskowitz, I., Shea, E.K.O., 2002. Yeast go the whole HOG for the hyperosmotic response. *Trends Genet.* 18, 405–412.
- Sales, K., Brandt, W., Rumbak, E., Lindsey, G., 2000. The LEA-like protein HSP 12 in *Saccharomyces cerevisiae* has a plasma membrane location and protects membranes against desiccation and ethanol-induced stress. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1463, 267–278. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00215-1](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00215-1).
- Sheth, C.C., Mogensen, E.G., Fu, M.S., Blomfield, I.C., Mühlshlegel, F.A., 2008. *Candida albicans* HSP12 is co-regulated by physiological CO₂ and pH. *Fungal Genet. Biol.* 45, 1075–1080. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.04.004>.
- Silveira, C.P., Piffer, A.C., Kmetzsch, L., Fonseca, F.L., Soares, D.A., Staats, C.C., Rodrigues, M.L., Schrank, A., Vainstein, M.H., 2013. The heat shock protein (Hsp) 70 of *Cryptococcus neoformans* is associated with the fungal cell surface and influences the interaction between yeast and host cells. *Fungal Genet. Biol.* 60, 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.08.005>.
- Singarapu, K.K., Tonelli, M., Chow, D.C., Frederick, R.O., Westler, W.M., Markley, J.L., 2011. Structural characterization of Hsp12, the heat shock protein from *Saccharomyces cerevisiae*, in aqueous solution where it is intrinsically disordered and in detergent micelles where it is locally α -helical. *J. Biol. Chem.* 286, 43447–43453. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.306464>.
- Thorpe, G.W., Reodica, M., Davies, M.J., Heeren, G., Jarolim, S., Pillay, B., Breitenbach, M., Higgins, V.J., Dawes, I.W., 2013. Superoxide radicals have a protective role during H₂O₂ stress. *Mol. Biol. Cell* 24, 2876–2884. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-01-0052>.
- Tiwari, S., Thakur, R., Shankar, J., 2015. Role of Heat-Shock Proteins in Cellular Function and in the Biology of Fungi. *Biotechnol. Res. Int.* 2015, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2015/132635>.
- Toffaletti, D.L., Rude, T.H., Johnston, S.A., Durack, D.T., Perfect, J.R., 1993. Gene Transfer in *Cryptococcus neoformans* by Use of Biolistic Delivery of DNA. *J. Bacteriol.* 175, 1405–1411.
- Upadhyay, R., Kim, H., Jung, K.W., Park, G., Lam, W., Lodge, J.K., Bahn, Y.S., 2013. Sulphiredoxin plays peroxiredoxin-dependent and -independent roles via the HOG signalling pathway in *Cryptococcus neoformans* and contributes to fungal virulence. *Mol. Microbiol.* 90 <https://doi.org/10.1111/mmi.12388>.
- Vigneron, A., Jehan, C., Rigaud, T., Moret, Y., 2019. Immune Defenses of a Beneficial Pest: The Mealworm Beetle. *Tenebrio molitor*. *Front. Physiol.* 10 <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00138>.
- Wang, Y., Aisen, P., Casadevall, A., 1995. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: Mechanism of action. *Infect. Immun.* 63, 3131–3136. <https://doi.org/10.1128/iai.63.8.3131-3136.1995>.
- Welker, S., Rudolph, B., Frenzel, E., Hagn, F., Liebisch, G., Schmitz, G., Scheuring, J., Kerth, A., Blume, A., Weinkauff, S., Haslbeck, M., Kessler, H., Buchner, J., 2010. Hsp12 is an Intrinsically Unstructured Stress Protein that Folds upon Membrane Association and Modulates Membrane Function. *Mol. Cell* 39, 507–520. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.08.001>.

8. REFERÊNCIAS

- ABDULRAHMAN, B. A. *et al.* Autophagy stimulation by rapamycin suppresses lung inflammation and infection by *Burkholderia cenocepacia* in a model of cystic fibrosis. **Autophagy**, [s. l.], v. 7, n. 11, p. 1359–1370, 2011.
- ACOSTA, N. *et al.* Sputum microbiota is predictive of long-term clinical outcomes in young adults with cystic fibrosis. **Thorax**, [s. l.], v. 73, n. 11, p. 1016–1025, 2018.
- AKSAMIT, T. R. *et al.* Adult Patients With Bronchiectasis. **Chest**, [s. l.], v. 151, n. 5, p. 982–992, 2017.
- AMATI, F. *et al.* The biology of pulmonary exacerbations in bronchiectasis. **European Respiratory Review**, [s. l.], v. 28, n. 154, p. 190055, 2019.
- ANURADHA, K. W. D. A.; GUNATHILAKA, P. K. G.; WICKRAMASINGHE, V. P. Effectiveness of hypertonic saline nebulization in airway clearance in children with non-cystic fibrosis bronchiectasis: A randomized control trial. **Pediatric Pulmonology**, [s. l.], v. 56, n. 2, p. 509–515, 2021.
- ATHANAZIO, R. A. *et al.* Brazilian guidelines for the diagnosis and treatment of cystic fibrosis. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, [s. l.], v. 43, n. 3, p. 219–245, 2017.
- BAREIL, C.; BERGOUGNOUX, A. *CFTR* gene variants, epidemiology and molecular pathology. **Archives de Pédiatrie**, [s. l.], v. 27, p. eS8–eS12, 2020.
- BASSIS, C. M. *et al.* Analysis of the Upper Respiratory Tract Microbiotas as the Source of the Lung and Gastric Microbiotas in Healthy Individuals. **mBio**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. e00037-15, 2015.
- BENLER, S. *et al.* Thousands of previously unknown phages discovered in whole-community human gut metagenomes. **Microbiome**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 78, 2021.
- BERGERON, C.; CANTIN, A. M. New Therapies to Correct the Cystic Fibrosis Basic Defect. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 12, p. 6193, 2021.
- BHAGIRATH, A. Y. *et al.* Cystic fibrosis lung environment and *Pseudomonas aeruginosa* infection. **BMC Pulmonary Medicine**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 174, 2016.
- BLAINEY, P. C. *et al.* Quantitative Analysis of the Human Airway Microbial Ecology Reveals a Pervasive Signature for Cystic Fibrosis. **Science Translational Medicine**, [s. l.], v. 4, n. 153, 2012. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.3004458>. Acesso em: 7 ago. 2023.
- BLANCHARD, A. C.; WATERS, V. J. Microbiology of Cystic Fibrosis Airway Disease. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, [s. l.], v. 40, n. 06, p. 727–736, 2019.

- BOBADILLA, J. L. *et al.* Cystic fibrosis: A worldwide analysis of CFTR mutations - correlation with incidence data and application to screening. **Human Mutation**, [s. l.], v. 19, n. 6, p. 575–606, 2002.
- BROWN, A. *et al.* How to perform and interpret the sweat test. **Archives of disease in childhood - Education & practice edition**, [s. l.], v. 105, n. 4, p. 230–235, 2020.
- CARNEY, S. M. *et al.* Methods in Lung Microbiome Research. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, [s. l.], v. 62, n. 3, p. 283–299, 2020.
- CHALMERS, J. D. *et al.* Bronchiectasis in Europe: data on disease characteristics from the European Bronchiectasis registry (EMBARC). **The Lancet Respiratory Medicine**, [s. l.], v. 11, n. 7, p. 637–649, 2023.
- CHALMERS, J. D. *et al.* Long-term macrolide antibiotics for the treatment of bronchiectasis in adults: an individual participant data meta-analysis. **The Lancet Respiratory Medicine**, [s. l.], v. 7, n. 10, p. 845–854, 2019.
- CHALMERS, J. D. *et al.* Neutrophil Elastase Activity Is Associated with Exacerbations and Lung Function Decline in Bronchiectasis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, [s. l.], v. 195, n. 10, p. 1384–1393, 2017.
- CHAPMAN, K. D.; MOFFETT, K. S. Cystic Fibrosis and COVID-19. **Southern Medical Journal**, [s. l.], v. 113, n. 9, p. 422–422, 2020.
- CHEN, S. *et al.* Application of metagenomic next-generation sequencing in the diagnosis and resistome analysis of community-acquired pneumonia pathogens from bronchoalveolar lavage samples. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 134, n. 6, p. 1xad102, 2023.
- COBIÁN GÜEMES, A. G. *et al.* Cystic Fibrosis Rapid Response: Translating Multi-omics Data into Clinically Relevant Information. **mBio**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. e00431-19, 2019.
- COLE, P. J. Inflammation: a two-edged sword--the model of bronchiectasis. **European Journal of Respiratory Diseases. Supplement**, [s. l.], v. 147, p. 6–15, 1986.
- COX, M. J. *et al.* Longitudinal assessment of sputum microbiome by sequencing of the 16S rRNA gene in non-cystic fibrosis bronchiectasis patients. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. e0170622, 2017.
- CSANÁDY, L.; VERGANI, P.; GADSBY, D. C. Structure, Gating, and Regulation of the CFTR Anion Channel. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 99, n. 1, p. 707–738, 2019.
- CUTHBERTSON, L. *et al.* Lung function and microbiota diversity in cystic fibrosis. **Microbiome**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 45, 2020.
- DACCÒ, V. *et al.* Cepacia syndrome in cystic fibrosis: A systematic review of the literature and possible new perspectives in treatment. **Pediatric Pulmonology**, [s. l.], v. 58, n. 5, p. 1337–1343, 2023.

- DAVIES, G. *et al.* The effect of *Pseudomonas aeruginosa* on pulmonary function in patients with bronchiectasis. **European Respiratory Journal**, [s. l.], v. 28, n. 5, p. 974–979, 2006.
- DAVIS, P. B. Cystic Fibrosis Since 1938. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, [s. l.], v. 173, n. 5, p. 475–482, 2006.
- DE ROSE, V. Mechanisms and markers of airway inflammation in cystic fibrosis. **European Respiratory Journal**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 333–340, 2002.
- DICKSON, R. P. *et al.* Spatial Variation in the Healthy Human Lung Microbiome and the Adapted Island Model of Lung Biogeography. **Annals of the American Thoracic Society**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 821–830, 2015.
- DICKSON, R. P. *et al.* The Microbiome and the Respiratory Tract. **Annual Review of Physiology**, [s. l.], v. 78, n. 1, p. 481–504, 2016.
- DICKSON, R. P.; MARTINEZ, F. J.; HUFFNAGLE, G. B. The role of the microbiome in exacerbations of chronic lung diseases. **The Lancet**, [s. l.], v. 384, n. 9944, p. 691–702, 2014.
- DURAZZI, F. *et al.* Comparison between 16S rRNA and shotgun sequencing data for the taxonomic characterization of the gut microbiota. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 3030, 2021.
- FEIGELMAN, R. *et al.* Sputum DNA sequencing in cystic fibrosis: non-invasive access to the lung microbiome and to pathogen details. **Microbiome**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 20, 2017.
- FLORES-VEGA, V. R. *et al.* Bacterial Subversion of Autophagy in Cystic Fibrosis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 11, p. 760922, 2021.
- FLUME, P. A.; CHALMERS, J. D.; OLIVIER, K. N. Advances in bronchiectasis: endotyping, genetics, microbiome, and disease heterogeneity. **The Lancet**, [s. l.], v. 392, n. 10150, p. 880–890, 2018.
- FLYNN, M.; DOOLEY, J. The microbiome of the nasopharynx. **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 70, n. 6, p. 001368, 2021.
- FRANÇOISE, A.; HÉRY-ARNAUD, G. The Microbiome in Cystic Fibrosis Pulmonary Disease. **Genes**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 536, 2020.
- FREDRIKSEN, S. *et al.* Resistome expansion in disease-associated human gut microbiomes. **Microbiome**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 166, 2023.
- GIBSON, R. L.; BURNS, J. L.; RAMSEY, B. W. Pathophysiology and Management of Pulmonary Infections in Cystic Fibrosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, [s. l.], v. 168, n. 8, p. 918–951, 2003.

GREEN, H.; JONES, A. The Microbiome and Emerging Pathogens in Cystic Fibrosis and Non-Cystic Fibrosis Bronchiectasis. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, [s. l.], v. 36, n. 02, p. 225–235, 2015.

GREGORY, A. C. *et al.* Smoking is associated with quantifiable differences in the human lung DNA virome and metabolome. **Respiratory Research**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 174, 2018.

GRUPO BRASILEIRO DE ESTUDOS DE FIBROSE CÍSTICA, G. **Brazilian Cystic Fibrosis Registry Report 2019**. [S. l.: s. n.], 2020. Annual report. Disponível em: <http://www.gbefc.org.br/ingles/site/pagina.php?idpai=128&id=15>. Acesso em: 17 ago. 2023.

GRUPO BRASILEIRO DE ESTUDOS DE FIBROSE CÍSTICA, G. **Brazilian Cystic Fibrosis Registry Report 2020**. [S. l.: s. n.], 2022. Annual report. Disponível em: <http://www.gbefc.org.br/ingles/site/pagina.php?idpai=128&id=15>. Acesso em: 17 ago. 2023.

HANSENS, L. S.; DUCHATEAU, J.; CASIMIR, G. J. CFTR Protein: Not Just a Chloride Channel?. **Cells**, [s. l.], v. 10, n. 11, p. 2844, 2021.

HAUSER, A. R. *et al.* Clinical Significance of Microbial Infection and Adaptation in Cystic Fibrosis. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 29–70, 2011.

HILLIAM, Y. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* adaptation and diversification in the non-cystic fibrosis bronchiectasis lung. **European Respiratory Journal**, [s. l.], v. 49, n. 4, p. 1602108, 2017.

HUANG, Y. J. *et al.* The airway microbiome in patients with severe asthma: Associations with disease features and severity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, [s. l.], v. 136, n. 4, p. 874–884, 2015.

IMAM, J. S.; DUARTE, A. G. Non-CF bronchiectasis: Orphan disease no longer. **Respiratory Medicine**, [s. l.], v. 166, p. 105940, 2020.

JACKSON, A. D.; GOSS, C. H. Epidemiology of CF: How registries can be used to advance our understanding of the CF population. **Journal of Cystic Fibrosis**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 297–305, 2018.

KENNEDY, J. L. *et al.* Outcomes of non-cystic fibrosis-related bronchiectasis post-lung transplantation. **Internal Medicine Journal**, [s. l.], v. 52, n. 6, p. 995–1001, 2022.

LAWRENCE; BALDRIDGE; HANDLEY. Phages and Human Health: More Than Idle Hitchhikers. **Viruses**, [s. l.], v. 11, n. 7, p. 587, 2019.

LEDDA, R. E. *et al.* Imaging in non-cystic fibrosis bronchiectasis and current limitations. **BJR|Open**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 20210026, 2021.

LEE, S. Y. *et al.* Airway microbiome composition correlates with lung function and arterial stiffness in an age-dependent manner. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 14, n. 11, p. e0225636, 2019.

LIBERTUCCI, J.; YOUNG, V. B. The role of the microbiota in infectious diseases. **Nature Microbiology**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 35–45, 2018.

LIM, Y. W. *et al.* Clinical Insights from Metagenomic Analysis of Sputum Samples from Patients with Cystic Fibrosis. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 52, n. 2, p. 425–437, 2014.

LOEBINGER, M. R. *et al.* Mortality in bronchiectasis: a long-term study assessing the factors influencing survival. **European Respiratory Journal**, [s. l.], v. 34, n. 4, p. 843–849, 2009.

LOPES, A. J. *et al.* Impact of Different Etiologies of Bronchiectasis on the Pulmonary Function Tests. **Clinical Medicine & Research**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 12–19, 2015.

LUKASIAK, A.; ZAJAC, M. The Distribution and Role of the CFTR Protein in the Intracellular Compartments. **Membranes**, [s. l.], v. 11, n. 11, p. 804, 2021.

MAC AOGÁIN, M. *et al.* Integrative microbiomics in bronchiectasis exacerbations. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 688–699, 2021.

MAC AOGÁIN, M. *et al.* Metagenomics Reveals a Core Macrolide Resistome Related to Microbiota in Chronic Respiratory Disease. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, [s. l.], v. 202, n. 3, p. 433–447, 2020.

MACFARLANE, L. *et al.* Diagnosis and management of non-cystic fibrosis bronchiectasis. **Clinical Medicine**, [s. l.], v. 21, n. 6, p. e571–e577, 2021.

MAHENTHIRALINGAM, E.; URBAN, T. A.; GOLDBERG, J. B. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 144–156, 2005.

MAN, W. H.; DE STEENHUIJSEN PITERS, W. A. A.; BOGAERT, D. The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 15, n. 5, p. 259–270, 2017.

MARTINEZ-GARCIA, M. A.; POLVERINO, E.; AKSAMIT, T. Bronchiectasis and Chronic Airway Disease. **Chest**, [s. l.], v. 154, n. 4, p. 737–739, 2018.

MCDONNELL, M. J. *et al.* Multidimensional severity assessment in bronchiectasis: an analysis of seven European cohorts. **Thorax**, [s. l.], v. 71, n. 12, p. 1110–1118, 2016.

MCDONNELL, M. J. *et al.* Non cystic fibrosis bronchiectasis: A longitudinal retrospective observational cohort study of *Pseudomonas* persistence and resistance. **Respiratory Medicine**, [s. l.], v. 109, n. 6, p. 716–726, 2015.

MINISTÉRIO DA SAUDE - BRASIL. **TabNet - Morbidade hospitalar por local de internação - Brasil**. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sih/cnv/nruf.def>. Acesso em: 1 set. 2023.

- MORALES-GONZÁLEZ, F. *et al.* Characterization of the lung microbiome and inflammatory cytokine levels in women exposed to environmental risk factors: A pilot study. **Immunity, Inflammation and Disease**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. e825, 2023.
- MORAN LOSADA, P. *et al.* The cystic fibrosis lower airways microbial metagenome. **ERJ Open Research**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 00096–02015, 2016.
- MYER, H.; CHUPITA, S.; JNAH, A. Cystic Fibrosis: Back to the Basics. **Neonatal Network**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 23–30, 2023.
- NATALINI, J. G.; SINGH, S.; SEGAL, L. N. The dynamic lung microbiome in health and disease. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 21, n. 4, p. 222–235, 2023.
- O'DONNELL, A. E. Bronchiectasis — A Clinical Review. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 387, n. 6, p. 533–545, 2022.
- OLIVEIRA, M. S. D. *et al.* Mortalidade por doença respiratória crônica no Brasil: tendência temporal e projeções. **Revista de Saúde Pública**, [s. l.], v. 56, p. 52, 2022.
- PEREIRA, M. C. *et al.* Brazilian consensus on non-cystic fibrosis bronchiectasis. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, [s. l.], v. 45, n. 4, p. e20190122, 2019.
- PETTIGREW, M. M.; TANNER, W.; HARRIS, A. D. The Lung Microbiome and Pneumonia. **The Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 223, n. Supplement_3, p. S241–S245, 2021.
- PIENKOWSKA, K. *et al.* The Cystic Fibrosis Upper and Lower Airway Metagenome. **Microbiology Spectrum**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. e03633-22, 2023.
- PRIOR, A.-R.; GUNARATNAM, C.; HUMPHREYS, H. *Ralstonia* species – do these bacteria matter in cystic fibrosis?. **Paediatric Respiratory Reviews**, [s. l.], v. 23, p. 78–83, 2017.
- RAMOS, K. J. *et al.* Lung transplant referral for individuals with cystic fibrosis: Cystic Fibrosis Foundation consensus guidelines. **Journal of Cystic Fibrosis**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 321–333, 2019.
- REN, C. L. *et al.* Presence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in respiratory cultures from cystic fibrosis patients is associated with lower lung function. **Pediatric Pulmonology**, [s. l.], v. 42, n. 6, p. 513–518, 2007.
- REYNOLDS, D.; KOLLEF, M. The Epidemiology and Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections: An Update. **Drugs**, [s. l.], v. 81, n. 18, p. 2117–2131, 2021.
- ROGERS, G. B. *et al.* The effect of long-term macrolide treatment on respiratory microbiota composition in non-cystic fibrosis bronchiectasis: an analysis from the randomised, double-blind, placebo-controlled BLESS trial. **The Lancet Respiratory Medicine**, [s. l.], v. 2, n. 12, p. 988–996, 2014.

SAIMAN, L. *et al.* Infection Prevention and Control Guideline for Cystic Fibrosis: 2013 Update. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, [s. l.], v. 35, n. S1, p. s1–s67, 2014.

SAIMAN, L.; SIEGEL, J. Infection control recommendations for patients with cystic fibrosis: Microbiology, important pathogens, and infection control practices to prevent patient-to-patient transmission. **American Journal of Infection Control**, [s. l.], v. 31, n. 3 Suppl, p. S1-62, 2003.

SANDERS, D. B. *et al.* Failure to Recover to Baseline Pulmonary Function after Cystic Fibrosis Pulmonary Exacerbation. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, [s. l.], v. 182, n. 5, p. 627–632, 2010.

SAVIN, I. A.; ZENKOVA, M. A.; SEN'KOVA, A. V. Pulmonary Fibrosis as a Result of Acute Lung Inflammation: Molecular Mechanisms, Relevant In Vivo Models, Prognostic and Therapeutic Approaches. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 23, p. 14959, 2022.

SCHÄFER, J. *et al.* Pathogenesis, imaging and clinical characteristics of CF and non-CF bronchiectasis. **BMC Pulmonary Medicine**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 79, 2018.

SCOTET, V.; L'HOSTIS, C.; FÉREC, C. The Changing Epidemiology of Cystic Fibrosis: Incidence, Survival and Impact of the *CFTR* Gene Discovery. **Genes**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 589, 2020.

SHTEINBERG, M. *et al.* Cystic fibrosis. **The Lancet**, [s. l.], v. 397, n. 10290, p. 2195–2211, 2021.

SONG, D.; CAHN, D.; DUNCAN, G. A. Mucin Biopolymers and Their Barrier Function at Airway Surfaces. **Langmuir**, [s. l.], v. 36, n. 43, p. 12773–12783, 2020.

SUBHAS, E.; REES, M. Bronchiectasis. **Australian Journal of General Practice**, [s. l.], v. 51, n. 12, p. 945–949, 2022.

TACCETTI, G. *et al.* Cystic Fibrosis: Recent Insights into Inhaled Antibiotic Treatment and Future Perspectives. **Antibiotics**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 338, 2021.

TAY, G.; REID, D.; BELL, S. Inhaled Antibiotics in Cystic Fibrosis (CF) and Non-CF Bronchiectasis. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, [s. l.], v. 36, n. 02, p. 267–286, 2015.

TUNNEY, M. M. *et al.* Lung Microbiota and Bacterial Abundance in Patients with Bronchiectasis when Clinically Stable and during Exacerbation. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, [s. l.], v. 187, n. 10, p. 1118–1126, 2013.

TURCIOS, N. L. Cystic Fibrosis Lung Disease: An Overview. **Respiratory Care**, [s. l.], v. 65, n. 2, p. 233–251, 2020.

WHITESIDE, S. A.; MCGINNISS, J. E.; COLLMAN, R. G. The lung microbiome: progress and promise. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 131, n. 15, p. e150473, 2021.

WINSTANLEY, C.; O'BRIEN, S.; BROCKHURST, M. A. *Pseudomonas aeruginosa* Evolutionary Adaptation and Diversification in Cystic Fibrosis Chronic Lung Infections. **Trends in Microbiology**, [s. l.], v. 24, n. 5, p. 327–337, 2016.

WOO, T. E. *et al.* A longitudinal characterization of the Non-Cystic Fibrosis Bronchiectasis airway microbiome. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 6871, 2019.

ZEMANICK, E. T.; SAGEL, S. D.; HARRIS, J. K. The airway microbiome in cystic fibrosis and implications for treatment. **Current Opinion in Pediatrics**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 319–324, 2011.

ZHANG, Y.; WANG, R. The human gut phageome: composition, development, and alterations in disease. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 14, p. 1213625, 2023.

ZHAO, J. *et al.* Decade-long bacterial community dynamics in cystic fibrosis airways. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 109, n. 15, p. 5809–5814, 2012.

ZHAO, C. Y. *et al.* Microbiome Data Enhances Predictive Models of Lung Function in People With Cystic Fibrosis. **The Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 223, n. Supplement_3, p. S246–S256, 2021.

9. CURRICULUM VITAE RESUMIDO

MOTTA, H.

MOTTA DE SOUZA, H.

DE SOUZA, H. M.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Heryk Motta de Souza

Local e data de nascimento: Esteio, Rio Grande do Sul, Brasil, 12 de maio de 1992.

Endereço profissional: Centro de Biotecnologia, Avenida Bento Gonçalves, 9500, Setor 4, Prédio 43421, laboratório 222, Porto Alegre, RS; CEP 91509-900.

Telefone profissional:

E-mail: heryk_ms@hotmail.com

2. FORMAÇÃO

Curso profissionalizante: Técnico em informática, Colégio Coração de Maria. Período: 2008-2009.

Curso de graduação: Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Período: 2013-2018.

Curso de Pós-Graduação concluído: Mestrado *stricto sensu* em Biologia Celular e Molecular pelo Programa De Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM), UFRGS. Período: 2018-2019.

Título: AVALIAÇÃO DO PAPEL DE PROTEÍNAS Hsp12 NA VIRULÊNCIA E RESPOSTA AO ESTRESSE DE *Cryptococcus gattii*.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Livia Kmetzsch Rosa e Silva

Coorientador: Prof Dr Charley Christian Staats

Curso de Pós-graduação em andamento: Doutorado *stricto sensu* em Biologia Celular e Molecular pelo Programa De Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM), UFRGS. Período: 2019-atual.

Título: AVALIAÇÃO DO PAPEL DE PROTEÍNAS Hsp12 NA VIRULÊNCIA E RESPOSTA AO ESTRESSE DE *Cryptococcus gattii*.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Livia Kmetzsch Rosa e Silva

Coorientadora: Prof^ª Dr^ª Marilene Henning Vainstein

2.1. FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Curso Real Time: Validação de métodos. Carga horária: 20h. Período: 2017-2017. Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil.

Curso Inglês. Carga horária: 54h. Período: 2016-2016. Sistema FIERGS SESI, Brasil.

Curso de Bioinformática para a Área da Saúde. Carga horária: 15h. Período: 2016-2016. Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil.

III Jornada do serviço de genética média da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Carga horária: 8h. Período: 2015-2015. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.

3. ESTÁGIOS

Vínculo: Estágio Curricular em Análises Clínicas. Instituição: Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil. Período: 2018-2018.

Vínculo: Estágio Curricular em Farmácia. Instituição: Fitonfarma, Brasil. Período: 2018-2018.

Vínculo: Bolsista de Iniciação Científica. Instituição: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil. Período: 2017-2018.

Projeto: Transportadores de cálcio de *Cryptococcus neoformans*: análise funcional no processo de interação patógeno-hospedeiro

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Livia Kmetzsch Rosa e Silva

Vínculo: Bolsista de Iniciação Científica. Instituição: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil. Período: 2017-2017.

Projeto: Transportadores de cálcio de *Cryptococcus neoformans*: análise funcional no processo de interação patógeno-hospedeiro

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Livia Kmetzsch Rosa e Silva

Vínculo: Bolsista de Iniciação Científica. Instituição: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil. Período: 2016-2017.

Projeto: Transportadores de zinco na interação patógeno-hospedeiro

Orientadora: Prof Dr Charley Christian Staats

Vínculo: Bolsista de Iniciação Científica. Instituição: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil. Período: 2015-2015.

Projeto: Estudo de Doenças Lisossômicas de Depósito

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Carmen Regla Vargas

Vínculo: Bolsista de Extensão. Instituição: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil. Período: 2013-2013.

Projeto: Programa de Descarte Consciente de Medicamentos – Parceria UFRGS/BHS

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Louise Marguerite Jeanty de Seixas

4. ARTIGOS COMPLETO PUBLICADOS

MOTTA, HERYK; CATARINA VIEIRA REUWSAAT, JÚLIA; DAIDRÊ SQUIZANI, EAMIM; DA SILVA CAMARGO, MATHEUS; WICHINE ACOSTA GARCIA, ANE; SCHRANK, AUGUSTO; HENNING VAINSTEIN, MARILENE; CHRISTIAN STAATS, CHARLEY; KMETZSCH, LÍVIA. The small heat shock protein Hsp12.1 has a major role in the stress response and virulence of *Cryptococcus gattii*. FUNGAL GENETICS AND BIOLOGY, v. 165, p. 103780, 2023. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2023.103780>

DAIDRÊ SQUIZANI, EAMIM; CATARINA VIEIRA REUWSAAT, JÚLIA; **MOTTA, HERYK;** TAVANTI, ANDREA; KMETZSCH, LIVIA. Calcium: a central player in *Cryptococcus* biology. FUNGAL BIOLOGY REVIEWS, v. 36, p. 27-41, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2021.03.004>.

OLIVEIRA, NATÁLIA KRONBAUER; FRANK, LUIZA ABRAHÃO; SQUIZANI, EAMIM DAIDRÊ; REUWSAAT, JULIA CATARINA VIEIRA; MARQUES, BÁRBARA MACHADO; **MOTTA, HERYK;** GARCIA, ANE WICHINE ACOSTA; KINSKOVSKI, URIEL PERIN; BARCELLOS, VANESSA ABREU; SCHRANK, AUGUSTO; POHLMANN, ADRIANA RAFFIN; STAATS, CHARLEY CHRISTIAN; GUTERRES, SÍLVIA STANISÇUASKI; VAINSTEIN, MARILENE HENNING; KMETZSCH, LÍVIA. New nanotechnological formulation based on amiodarone-loaded lipid core nanocapsules displays anticryptococcal effect. EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, v. 162, p. 105816, 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2021.105816>

REUWSAAT, JULIA C. V.; AGUSTINHO, DANIEL P.; **MOTTA, HERYK;** CHANG, ANDREW L.; BROWN, HOLLY; BRENT, MICHAEL R.; KMETZSCH, LIVIA; DOERING, TAMARA L. The Transcription Factor Pdr802 Regulates Titan Cell Formation and Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. mBio, v. 12, p. 1-20, 2021. <http://dx.doi.org/10.1128/mbio.03457-20>

SBARAINI, NICOLAU; HU, JINYU; ROUX, INDRA; PHAN, CHIN-SOON; **MOTTA, HERYK;** REZAEI, HAMIDEH; SCHRANK, AUGUSTO; CHOOI, YIT-HENG; STAATS, CHARLEY CHRISTIAN. Polyketides produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* induce *Candida albicans* growth. FUNGAL GENETICS AND BIOLOGY, v. 152, p. 103568, 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2021.103568>

SQUIZANI, EAMIM DAIDRÊ; REUWSAAT, JÚLIA CATARINA VIEIRA; LEV, SOPHIE; **MOTTA, HERYK**; SPEROTTO, JULIA; KAUFMAN-FRANCIS, KEREN; DESMARINI, DESMARINI; VAINSTEIN, MARILENE HENNING; STAATS, CHARLEY CHRISTIAN; DJORDJEVIC, JULIANNE T.; KMETZSCH, LÍVIA. Calcium Binding Protein Ncs1 Is Calcineurin Regulated in *Cryptococcus neoformans* and Essential for Cell Division and Virulence. *mSphere*, v. 5, p. 1, 2020. <http://dx.doi.org/10.1128/msphere.00761-20>

GARCIA, ANE WICHINE ACOSTA; KINSKOVSKI, URIEL PERIN; DIEHL, CAMILA; REUWSAAT, JÚLIA CATARINA VIEIRA; **MOTTA DE SOUZA, HERYK**; PINTO, HELBER BARBOZA; TRENTIN, DANIELLE DA SILVA; DE OLIVEIRA, HAROLDO CESAR; RODRIGUES, MARCIO L.; BECKER, EMILENE MENDES; KMETZSCH, LIVIA; VAINSTEIN, MARILENE HENNING; STAATS, CHARLEY CHRISTIAN. Participation of Zip3, a ZIP domain-containing protein, in stress response and virulence in *Cryptococcus gattii*. *FUNGAL GENETICS AND BIOLOGY*, v. 144, p. 103438, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2020.103438>

REUWSAAT, JULIA CATARINA VIEIRA; **MOTTA, HERYK**; GARCIA, ANE WICHINE ACOSTA; VASCONCELOS, CAROLINA BETTKER; MARQUES, BÁRBARA MACHADO; OLIVEIRA, NATÁLIA KRONBAUER RODRIGUES, JÉSSICA; FERRAREZE, PATRÍCIA ALINE GRÖHNS; FRASES, SUSANA; LOPES, WILLIAM; BARCELLOS, VANESSA ABREU; SQUIZANI, EAMIM DAIDRÊ; HORTA, JORGE ANDRÉ; SCHRANK, AUGUSTO; RODRIGUES, MARCIO LOURENÇO; STAATS, CHARLEY CHRISTIAN; VAINSTEIN, MARILENE HENNING; KMETZSCH, LÍVIA. A Predicted Mannoprotein Participates in *Cryptococcus gattii* Capsular Structure. *mSphere*, v. 3, p. e00023-18, 2018. <http://dx.doi.org/10.1128/msphere.00023-18>

DIAZ JACQUES, CARLOS EDUARDO; **DE SOUZA, HERYK M.**; SPEROTTO, NATHALIA D.M.; VERÍSSIMO, RODRIGO M.; DA ROSA, HELEN T.; MOURA, DINARA J.; SAFFI, JENIFER; GIUGLIANI, ROBERTO; VARGAS, CARMEN REGLA. Hunter syndrome: Long-term idursulfase treatment does not protect patients against DNA oxidation and cytogenetic damage. *MUTATION RESEARCH-GENETIC TOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL MUTAGENESIS*, v. 835, p. 21-24, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.08.013>

BIANCINI, GIOVANA BRONDANI; JACQUES, CARLOS EDUARDO; HAMMERSCHMIDT, TATIANE; **DE SOUZA, HERYK MOTTA**; DONIDA, BRUNA; DEON, MARION; VAIRO, FILIPPO PINTO; LOURENÇO, CHARLES MARQUES; GIUGLIANI, ROBERTO; VARGAS, CARMEN REGLA. Biomolecules damage and redox status abnormalities in Fabry patients before and during enzyme replacement therapy. *CLINICA CHIMICA ACTA*, v. 461, p. 41-46, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2016.07.016>

5. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

MOTTA, H., REUWSAAT, J.C.V., CAMARGO, M.S., VAINSTEIN, M.H., STAATS, C.C., KMETZSCH, L., 2021. The role of *hsp12* genes in stress response and virulence of *Cryptococcus gattii*. 31° Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2021, *online*.

DE SOUZA, H.M.; REUWSAAT, J.C.V.; MARQUES, B.M.; VASCONCELOS, C.B.; SCHRANK, A.; STAATS, C.C.; VAINSTEIN, M.H.; KMETZSCH, L., 2017. A *Cryptococcus gattii* recombinant mannoprotein as a potential candidate for immunotherapy. 10th International Conference on *Cryptococcus* and Cryptococcosis, 2017, Foz do Iguaçu.