

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

TAMIRES DE LIMA MARQUES

**ANÁLISE DO PERFIL DE *SPLICING* ALTERNATIVO DE GENES DO PATÓGENO
OPORTUNISTA *Cryptococcus neoformans* DURANTE O PROCESSO INFECCIOSO
EM MODELO MURINO**

Belo Horizonte

2023

TAMIRES DE LIMA MARQUES

**ANÁLISE DO PERFIL DE *SPLICING* ALTERNATIVO DE GENES DO PATÓGENO
OPORTUNISTA *Cryptococcus neoformans* DURANTE O PROCESSO
INFECCIOSO EM MODELO MURINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Daniel de Assis Santos

Coorientadora: Nalu Teixeira de Aguiar Peres

Belo Horizonte

2023

043

Marques, Tamires de Lima.

Análise do perfil de splicing alternativo de genes do patógeno oportunista *Cryptococcus neoformans* durante o processo infeccioso em modelo murino [manuscrito] / Tamires de Lima Marques. – 2023.

205 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Daniel de Assis Santos. Coorientadora: Nalu Teixeira de Aguiar Peres.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Criptococose. 3. Micoses. 4. RNA-Seq. 5. Interações Hospedeiro-Patógeno. I. Santos, Daniel de Assis. II. Peres, Nalu Teixeira de Aguiar. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE **TAMIRES DE LIMA MARQUES**

Nº REGISTRO: **2021665830**

Às 14:00 horas do dia **25 de abril de 2023**, reuniu-se por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Luiz Henrique Rosa (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Clayton Luiz Borges (Universidade Federal de Goiás), Prof. Dr. Daniel de Assis Santos (Orientador) e a Profa. Dra. Nalu Teixeira de Aguiar Peres (Coorientadora), para julgar o trabalho final "**Análise do perfil de Splicing alternativo de genes do patógeno oportunista *Cryptococcus neoformans* durante o processo infeccioso em modelo murino**", da aluna **Tamires de Lima Marques**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Dr. Daniel de Assis Santos - orientador, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. A candidata tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 25 de abril de 2023

Membros da banca:

Prof. Dr. Luiz Henrique Rosa

Prof. Dr. Clayton Luiz Borges

De acordo:

Prof. Dr. Daniel de Assis Santos

(Orientador)

Profa. Dra. Nalu Teixeira de Aguiar Peres

(Coorientadora)

Profa. Dra. Daniele da Glória de Souza
(Coordenadora do Programa de Pós-graduação
em Microbiologia)



Documento assinado eletronicamente por **Daniel de Assis Santos, Professor do Magistério Superior**, em 26/04/2023, às 08:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Nalu Teixeira de Aguiar Peres, Professora do Magistério Superior**, em 26/04/2023, às 09:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Henrique Rosa, Professor do Magistério Superior**, em 26/04/2023, às 10:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniele da Glória de Souza, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 27/04/2023, às 16:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Clayton Luiz Borges, Usuário Externo**, em 02/05/2023, às 10:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2216779** e o código CRC **544E39C5**.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à minha família: minha mãe, Rosana, que, ao longo da minha trajetória escolar, constantemente me incentivou e suportou de todas as formas, além de sempre fazer o máximo para me proporcionar boas oportunidades. Ao meu pai Adair, que sempre me protegeu e me auxiliou quando necessário. Ao meu irmão Gabriel, que sempre esteve disposto a me fazer rir e a me levar onde precisei. Aos meus avós e tios, que me encorajaram a sempre perseguir meus sonhos, não importando as dificuldades. Sem vocês, nada eu seria.

Ao meu marido, Marcelo, que era apenas meu namorado quando a jornada do mestrado começou. Obrigada por evoluir comigo, e também por sempre estar presente, me amando, apoiando e trazendo calma nos momentos em que o desespero tomou conta de mim.

Aos meus amigos, especialmente à Nanda, Duda e Bebela, que me encheram de carinho e me animaram sempre que as coisas estavam complicadas. Também ao Marcelo, que se encontrava aqui quando todo esse processo se iniciou, mas que se foi cedo demais. Obrigada por serem vocês!

Aos meus orientadores, Nalu e Daniel, que são os melhores que eu poderia ter. Agradeço pela paciência, pelas palavras de apoio nos momentos difíceis e pelo conhecimento transmitido. Um dia, gostaria de ser uma professora tão boa quanto vocês.

Aos meus colegas do LabMic, que me acompanharam ao longo desses anos e que fizeram do laboratório um ótimo ambiente de trabalho, com leveza, companheirismo e boas conversas.

À UFMG, que foi uma segunda casa para mim nos últimos sete anos e onde pude me formar bióloga e ter o prazer de cursar uma pós-graduação tão renomada, em uma universidade tão relevante. Foram maravilhosas experiências que jamais serão esquecidas. Finalmente, ao CNPq, pelo apoio financeiro.

"If you can dream it, you can do it."

Walt Disney

RESUMO

A levedura *Cryptococcus neoformans* é um basidiomiceto ambiental, mas que, quando inalado por um indivíduo imunocomprometido, se torna um patógeno oportunista, causando a criptococose. Tal doença se manifesta causando quadros moderados, como pneumonias, e graves, como meningites – sendo essa última manifestação, causa de muitas mortes. Por ser um eucarioto, *C. neoformans* apresenta o *splicing alternativo* (AS) como forma de produzir mais de uma proteína a partir de um mesmo gene e, também, como forma de regulação gênica em resposta às influências ambientais. O estudo dos perfis de AS em resposta às condições de infecção, assim como suas consequências para esse fungo patogênico, são essenciais para a compreensão dos sistemas moleculares necessários à sobrevivência deste no hospedeiro. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi analisar a ocorrência, o perfil e o papel do *splicing* alternativo de genes em *C. neoformans*, após 6 horas e 10 dias de infecção em hospedeiro murino experimental. Para tal, 24 camundongos C57BL/6 foram infectados via intratraqueal com 1×10^6 células de *C. neoformans*. O Lavado Broncoalveolar (BAL) foi recolhido após 6 horas de infecção em metade dos animais (n=12) e após 10 dias na outra metade (n=12), de forma que fosse possível analisar o transcriptoma da levedura e comparar com a condição controle, que consistiu no cultivo do fungo em meio YPD *overnight*. A extração do RNA e o sequenciamento do transcriptoma foram realizadas e os dados de RNA-seq foram analisados usando as ferramentas DEXseq e rMATS, para investigar como se dá o *splicing* alternativo em genes expressos por *C. neoformans*, na condição de infecção inicial (após 6 horas) e de infecção tardia (10 dias), comparado ao controle em meio de cultura YPD. Os resultados indicam 221 eventos de uso diferencial de éxons (DEU) e 1281 eventos de *splicing* alternativo diferencial (DAS), dentre eles: Retenção de íntrons (IR), Éxons mutuamente excludentes (MXE), Sítio alternativo de *splicing* 3' e 5' (A3'SS e A5'SS) e Uso alternativo de éxons (ES), sendo este último o mais frequente nas condições de infecção, em comparação com o controle. Não obstante, os resultados indicaram possíveis eventos não anotados de AS, em pelo menos dois genes de *C. neoformans*. Ademais, as análises fornecem uma boa correlação entre estes eventos de AS e a expressão aumentada de genes envolvidos em vias conhecidamente importantes na adaptação, sobrevivência e virulência do patógeno *C. neoformans* no contexto da infecção, como obtenção de energia, replicação celular e obtenção de cobre – o que evidencia a relevância do AS para o microrganismo, agindo como um mecanismo de controle gênico pós-transcricional em resposta à estímulos ambientais. Desta forma, trabalhos como este – que fornecem informações relevantes quanto às diferenças de *splicing* presentes no patógeno oportunista *C. neoformans* entre condições de infecção e de não infecção – são cruciais para se compreender a dinâmica da interação *C. neoformans*-mamífero, bem como para gerar subsídios para proposição de estratégias de controle deste patógeno, bem como da criptococose.

Palavras-chave: criptococose; infecção fúngica; RNA-seq duplo; regulação; interação patógeno-hospedeiro.

ABSTRACT

The yeast *Cryptococcus neoformans* is an environmental basidiomycete, that when inhaled by an immunocompromised person, becomes an opportunistic pathogen, causing the cryptococcosis. This disease manifests itself causing moderate conditions, such as pneumonias, and severe, such as meningitis - the latter being the cause of many deaths. As it is an eukaryote, *C. neoformans* presents Alternative Splicing (AS) as a way to produce more than one protein from the same gene and also as a form of gene regulation in response to environmental influences. The study of the profiles of AS in response to the infection environment, as well as its consequences for this pathogenic fungus, is essential to understanding the molecular systems necessary for its survival in the host. In this sense, the aim of this work was to analyze the occurrence, the profile and role of alternative splicing of *C. neoformans* genes, after 6 hours and 10 days of infection in experimental murine host. To this end, 24 C57BL/6 mice were intratracheally infected with 1×10^6 cells of *C. neoformans*. Bronchoalveolar lavage (BAL) was collected after 6 hours of infection in half of the animals (n=12) and after 10 days in the other half (n=12), so that it was possible to analyze the fungal transcriptome and compare with the control condition, which consisted of cultivating the fungus in YPD medium overnight. RNA extraction and transcriptome sequencing were performed and, then, the RNA-seq data were analyzed using the DEXseq and rMATS tools, to investigate how alternative splicing occurs in genes expressed by *C. neoformans*, in the condition of initial infection (after 6 hours) and late infection (10 days), compared to the control in YPD culture medium. The results show 221 differential exon usage (DEU) events and 1281 events of differential alternative splicing (DAS), among them: Intron retention (IR), Mutually exclusive exons (MXE), Alternative splice site 3' and 5' (A3'SS and A5'SS) and exon skipping (ES), the latter being the most frequent in the conditions of infection, in comparison to the control condition. Nevertheless, the results indicated possible unannotated AS events in at least two *C. neoformans* genes. Furthermore, the analyzes provide a good correlation between these AS events and the increased expression of genes involved in pathways known to be important in the adaptation, survival and virulence of the *C. neoformans* pathogen in the context of infection, such as energy harvesting, cell replication and copper uptake – which evidences the biological role of AS for the microorganism, acting as a post-transcriptional gene control mechanism in response to environmental stimuli. Thus, works like this one – which provide relevant information regarding the splicing differences present in the opportunistic pathogen *C. neoformans* between conditions of infection and non-infection – are crucial to understand the dynamics of the interaction *C. neoformans*-mammal, as well as to generate income for proposing strategies to control this pathogen, as well as cryptococcosis.

Keywords: cryptococcosis; fungal infection; dual RNA-seq; regulation; host-pathogen I-interaction.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema que mostra a distribuição espacial de *C. neoformans* var. *grubii* e patogênese geral da criptococose. Observa-se a distribuição global do fungo, se encontrando naturalmente em ambientes como cascas de árvores, solo e guano de aves. A infecção se inicia com a aspiração deste microrganismo, que se instala nos alvéolos pulmonares. A partir deste momento, o patógeno é reconhecido e eliminado pelo sistema imune de um hospedeiro imunocompetente. Já em um hospedeiro imunodeficiente, não há a resolução da infecção nos pulmões e há o agravamento do quadro clínico..... 19
- Figura 2.** Padrões de *Splicing* Alternativo mais comuns. Observa-se a representação gráfica de: Retenção de íntrons, Uso alternativo de éxons, Sítio alternativo de *splicing* 5', Sítio alternativo de *splicing* 3' e Éxons mutuamente excludentes, bem como seus mRNAs resultantes..... 30
- Figura 3:** Esquema da metodologia realizada para a obtenção das células de *C. neoformans* durante a infecção e controle. O lavado broncoalveolar (BAL) dos animais foi obtido em estágios inicial e tardio da infecção (6 horas e 10 dias após a infecção intratraqueal), para a obtenção das células do patógeno e posterior extração do RNA..... 38
- Figura 4:** Diagrama de Venn mostrando a distribuição dos 221 genes de *C. neoformans* que apresentaram uso diferencial de éxons nas três comparações estudadas (6h vs. YPD e 10d vs. YPD e 6h vs. 10d) 49
- Figura 5:** Sashimi plot do gene CNAG_02751 (*Short-chain dehydrogenase*) nas condições YPD (em vermelho), BAL6h (em verde) e BAL10d (em azul claro). A região marcada revela a região onde houve o uso alternativo de éxon (ES) no 3º éxon do gene, na condição YPD..... 52
- Figura 6:** Sashimi plot do gene CNAG_02751 (*Short-chain dehydrogenase*) nas condições YPD (em vermelho), BAL6h (em verde) e BAL10d (em azul claro). A região marcada revela a região onde houve o uso alternativo de éxon (ES) no 6º éxon do gene, na condição YPD..... 53

Figura 7: Diagrama de Venn mostrando o número de genes de <i>C. neoformans</i> que apresentaram <i>splicing</i> alternativo diferencial nas três comparações estudadas (6h vs. YPD, 6h vs. 10d e 10d vs. YPD)	54
Figura 8: Diagrama de Venn mostrando o número de genes de <i>C. neoformans</i> que apresentaram cada tipo de <i>splicing</i> alternativo diferencial nas comparações: (A) 6h vs. YPD, (B) 10d vs. YPD e (C) 6h vs. 10d.	55
Figura 9: Sashimi plot do gene CNAG_05734 (SLA2 - <i>cell wall organization and biogenesis-related protein</i>) nas condições BAL6h e YPD. (A) Destaca a região onde houve a retenção de íntrons (IR), na condição YPD em relação a 6h. (B) Destaca o uso alternativo de éxon (ES), na condição 6h em relação ao YPD.....	56
Figura 10: Localização genômica dos genes de <i>C. neoformans</i> que apresentaram uso diferencial de éxons nas três comparações estudadas (6h vs. YPD, 6h vs. 10d e 10d vs. YPD). Observa-se uma distribuição coesa dos genes ao longo do genoma.....	57
Figura 11: Localização genômica dos genes de <i>C. neoformans</i> que apresentaram DAS nas três comparações estudadas (6h vs. YPD, 6h vs. 10d e 10d vs. YPD). Observa-se uma distribuição coesa dos genes ao longo do genoma, com exceção da mitocôndria.....	58
Figura 12: Porcentagem de genes de <i>C. neoformans</i> que apresentaram DEU (A), (B) e (C) e DAS (D), (E), (F), em relação à quantidade de transcritos anotados nas três comparações estudadas. Observa-se uma maior quantidade de genes com apenas um transcrito anotado na análise DEU e uma maior quantidade de genes com dois ou mais transcritos anotados na análise DAS.....	59
Figura 13: Relação entre a porcentagem de genes de <i>C. neoformans</i> que apresentaram DEU (A-C) e DAS (D-F), considerando os genes nas comparações: 6h vs. YPD, 6h vs. 10d e 10d vs. YPD. Observa-se que a maioria dos genes possui de 1 a 10 íntrons.....	60
Figura 14: Porcentagem de genes que codificam Proteínas anotadas, Proteínas hipotéticas ou Produto inespecífico, dentre os genes de <i>C. neoformans</i> que apresentaram DEU (A-C) e DAS (D-F), nas comparações estudadas. Observa-se que, nas três comparações das duas análises, têm-se que a maioria dos genes codifica	

uma proteína anotada, com exceção da comparação 6h vs. 10d na análise DAS, em que a maioria dos genes codifica uma proteína hipotética..... 62

Figura 15: Categorização funcional baseada em processos biológicos (GO) dos genes de *C. neoformans* que apresentaram: (A) DEU e (B) DAS, na comparação 6h vs. YPD. A maioria dos genes com DEU está relacionada à biossíntese de compostos organonitrogenados, enquanto a maioria dos genes com DAS estão relacionados com processos de transporte..... 64

Figura 16: Categorização funcional baseada em processos biológicos (GO) dos genes de *C. neoformans* que apresentaram: (A) DEU e (B) DAS, na comparação 10d vs. YPD. A maioria dos genes com DEU está relacionada à resposta ao estresse salino, enquanto a maioria dos genes com DAS estão relacionados com processos de transporte..... 64

Figura 17: Categorização funcional baseada em processos biológicos (GO) dos genes de *C. neoformans* que apresentaram: (A) DEU e (B) DAS, na comparação 6h vs. 10d. A maioria dos genes com DEU está relacionada à biossíntese de ácido carboxílico, enquanto a maioria dos genes com DAS estão relacionados à regulação da biossíntese de RNA..... 65

Figura 18: Diagrama de Venn demonstrando o número de genes de *C. neoformans* que apresentaram DAS (verde) e apresentaram expressão diferencial positiva (vermelho) e negativa (azul claro) na comparação 6h vs. YPD..... 66

Figura 19: Diagrama de Venn demonstrando o número de genes de *C. neoformans* que apresentaram DAS (azul escuro) e que apresentaram expressão diferencial positiva (vermelho) e expressão diferencial negativa (azul claro) na comparação 10d vs. YPD..... 67

Figura 20: Diagrama de Venn demonstrando o número de genes de *C. neoformans* que apresentaram DAS (amarelo) e apresentaram expressão diferencial positiva (vermelho) e negativa (azul claro) na comparação 6h vs. 10d..... 67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados oriundos de sequenciamento genômico das amostras analisadas.	46
Tabela 2: Dados oriundos do alinhamento das sequências geradas em cada condição ao genoma de referência (<i>C. neoformans</i> H99)	47
Tabela 3: Quantidade de eventos e tipos de DAS em genes de <i>C. neoformans</i> em cada comparação realizada	49
Tabela 4: Quantidade total de genes de <i>C. neoformans</i> que apresentaram DAS em cada comparação realizada.	50
Tabela 5: Quantidade de genes de <i>C. neoformans</i> que apresentaram algum tipo de DAS em cada comparação estudada(*)	54
Tabela 6: Quantidade de genes de <i>C. neoformans</i> que apresentaram DEU classificados em relação à anotação.	61
Tabela 7: Quantidade de genes de <i>C. neoformans</i> que apresentaram AS classificados em relação à anotação.	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- A5'SS:** Sítio alternativo de splicing 5' (do inglês *Alternative 5' Splice Site*)
- A3'SS:** Sítio alternativo de splicing 3' (do inglês *Alternative 3' Splice Site*)
- AIDS:** Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (do inglês *Acquired Immunodeficiency Syndrome*)
- AS:** *Splicing* alternativo (do inglês *Alternative Splicing*)
- BAL:** Lavado broncoalveolar (do inglês, *Bronchoalveolar Lavage*)
- DAS:** *Splicing* alternativo diferencial (do inglês *Differential Alternative Splicing*)
- DEU:** Uso diferencial de éxons (do inglês *Differential Exon Usage*)
- DNA:** Ácido Desoxirribonucleico (do inglês, *Deoxyribonucleic Acid*)
- ES:** Uso alternativo de éxon (do inglês, *Exon Skipping*)
- HIV:** Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês *Human Immunodeficiency Virus*)
- IR:** Retenção de íntrons (do inglês, *Intron Retention*)
- mRNA:** RNA mensageiro (do inglês, *Messenger Ribonucleic Acid*)
- MXE:** Éxons mutuamente excludentes (do inglês, *Mutually Exclusive Exons*)
- ncRNA:** RNA não codificante (do inglês, *Non-coding Ribonucleic Acid*)
- RNA:** Ácido ribonucleico (do inglês, *Ribonucleic Acid*)
- Pré-mRNA:** RNA mensageiro recém-sintetizado, antes de sofrer *splicing*
- PCR:** Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)
- SNC:** Sistema Nervoso Central
- YPD:** Meio de cultura composto por Extrato de levedura, peptona e dextrose (do inglês, *Yeast extract Peptone Dextrose*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. CRIPTOCOCOSE	16
1.1.1. <i>Patogênese e manifestações clínicas</i>	17
1.2. <i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i>	19
1.2.1. <i>Genoma de Cryptococcus spp.</i>	23
1.3. RELAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO	24
1.3.1. <i>Sobrevivência no hospedeiro</i>	24
1.3.1.1. <i>Adaptação ao ambiente e resposta a estresses</i>	24
1.3.1.2. <i>Produção de fatores de virulência</i>	25
1.3.1.3. <i>Evasão do sistema imune</i>	26
1.3.2. <i>O transcriptoma de C. neoformans durante a infecção</i>	27
1.4. <i>SPLICING ALTERNATIVO (AS)</i>	29
1.4.1. <i>Importância do processo</i>	31
2. JUSTIFICATIVA	32
3. OBJETIVOS	35
3.1. OBJETIVO GERAL	35
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4. METODOLOGIA	36
4.1. LINHAGEM DE <i>CRYPTOCOCCUS</i> , CULTIVO E MANUTENÇÃO	36
4.2. PREPARO DO INÓCULO	36
4.3. EXPERIMENTO EM MODELO MURINO	36
4.3.1. <i>Infecção intratraqueal</i>	37
4.3.2. <i>Coleta do lavado broncoalveolar (BAL)</i>	37
4.3.3. <i>Condição controle</i>	38
4.4. EXTRAÇÃO E MAPEAMENTO DO RNA	38
4.5. ANÁLISES DE PROCESSAMENTO DIFERENCIAL DE GENES	42
4.5.1. <i>Análise de uso diferencial dos éxons (DEU)</i>	42
4.5.2. <i>Análise de Splicing alternativo Diferencial (DAS) e a identificação dos tipos de Splicing alternativo (AS)</i>	42
4.5.3. <i>Anotação e categorização funcional dos genes que sofreram DAS</i>	44
4.6. VISUALIZAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS	45
5. RESULTADOS	46
5.1. SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS ESTUDADAS	46
5.2. ALINHAMENTO AO GENOMA DE REFERÊNCIA	46
5.3. ANÁLISE DE PROCESSAMENTO DIFERENCIAL DOS GENES	47
5.3.1. <i>Caracterização global dos eventos de DEU e DAS</i>	48
5.3.1.1. <i>Número de eventos e genes que apresentam DEU ou DAS</i>	48
5.3.1.2. <i>Localização genômica, número de íntrons e anotação dos genes que apresentam DEU ou DAS</i>	56
5.3.1.3. <i>Identificação e Enriquecimento funcional (GO – Gene Ontology) dos genes que apresentaram DEU ou DAS</i>	60
5.4 GENES QUE APRESENTAM DAS E SÃO DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS (DE) NAS CONDIÇÕES ESTUDADAS	65
6. DISCUSSÃO	69

7. CONCLUSÕES	83
8. PERSPECTIVAS	84
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
ANEXO 1: TABELAS COM TODOS OS GENES RESULTANTES DAS ANÁLISES DE USO DIFERENCIAL DE ÉXONS (DEU) PARA <i>Cryptococcus neoformans</i>	102
ANEXO 2: TABELAS COM TODOS OS GENES RESULTANTES DAS ANÁLISES DE <i>SPLICING</i> ALTERNATIVO DIFERENCIAL PARA <i>Cryptococcus neoformans</i>	119

1. INTRODUÇÃO

1.1. Criptococose

A criptococose é uma infecção invasiva, oportunista e de abrangência mundial, sendo responsável por mais de 900 mil casos diagnosticados por ano e por 15% das mortes relacionadas à AIDS (PARK *et al.*, 2009; RAJASINGHAM *et al.*, 2017). Juntamente com a candidíase e aspergilose, a criptococose é uma das micoses oportunistas mais importantes globalmente e, por isso, estas doenças e seus respectivos patógenos são alvos de diversos trabalhos (PFALLER *et al.*, 2004; PFALLER *et al.*, 2011; BASSETTI *et al.*, 2020; STRICKLAND & SHI, 2021). Os principais agentes etiológicos da doença são dois fungos leveduriformes do gênero *Cryptococcus*: *C. neoformans* e *C. gattii*, sendo a primeira espécie a mais prevalente, ao afetar indivíduos imunossuprimidos ao redor de todo o globo, enquanto a segunda tem distribuição tropical e já é reconhecida por ser capaz de causar infecção em hospedeiros imunocompetentes (CHEN *et al.*, 2000; PARK *et al.*, 2009). Ademais desses dois agentes, também já foram descritos casos de criptococose por outras duas espécies do mesmo gênero: *C. laurentii* e *C. albidus*, apesar desses dois patógenos possuírem baixa relevância clínica pela baixa quantidade de casos invasivos causados por tais (CANO *et al.*, 2020).

Nesse sentido, os principais fatores de risco para o desenvolvimento da criptococose são aqueles relacionados à imunodeficiências, como: doenças do sistema imune, cânceres, uso de medicamentos imunossupressores, transplantes de órgãos, cirrose e, principalmente, a infecção por HIV e o desenvolvimento da AIDS (SETIANINGRUM *et al.*, 2019). Outrossim, recentemente, com a pandemia de COVID-19, foram também relatados casos de cryptococcemia e meningoencefalite criptocócica em pacientes durante e após infecções pelo SARS-CoV-2 (GHANEM & SIVASUBRAMANIAN, 2021; THYAGARAJAN *et al.*, 2021).

O tratamento da doença varia de acordo com o estado de cada paciente, já que suas condições prévias devem ser consideradas (SABIITI & MAY, 2012). Nos últimos anos, tem se observado o surgimento de linhagens resistentes de *Cryptococcus* spp, sendo sempre necessária a busca por novas terapias. Entretanto, atualmente, para o tratamento da criptococose, é recomendada a combinação entre Anfotericina B e Flucitosina, seguida por uma terapia com fluconazol (PERFECT *et al.*, 2010; WHO

FPPL, 2022). A primeira droga age se ligando ao ergosterol da membrana fúngica e causando poros nesta, o que leva ao extravasamento de moléculas e à morte celular. Outrossim, ela aumenta a concentração de radicais livres, e, conseqüentemente, o estresse oxidativo que é tão nocivo ao fungo (MESA-ARANGO *et al.*, 2014; CARMONA & LIMPER, 2017). Já a Flucitosina bloqueia ativamente a síntese de DNA e de proteínas, se ligando ao próprio DNA e ao RNA, respectivamente (CARMONA & LIMPER, 2017). Contudo, há países onde a Flucitosina não é encontrada, a combinação entre Anfotericina B e Fluconazol é frequentemente utilizada (KWON-CHUNG *et al.*, 2014; SLOAN & PARRIS, 2014) no tratamento. O fluconazol age na biossíntese do ergosterol, resultando em uma membrana celular mais permeável, que não suporta manter a integridade da célula fúngica, levando à morte do microrganismo (CARMONA & LIMPER, 2017).

A manifestação mais grave da criptococose se dá com o desenvolvimento de meningites e meningoencefalites – inflamações sérias das meninges e do parênquima cerebral, respectivamente – que causam lesões císticas no sistema nervoso central (SNC) e prejudicam severamente a saúde do hospedeiro e, por conseqüência, causam grande número de mortes (SABIITI & MAY, 2012; NGAMSKULRUNGROJ *et al.*, 2012). Entretanto, a criptococose pode se manifestar através de casos leves e mais fáceis de tratar, causando quadros pulmonares, como pneumonias, uma vez que, normalmente, a infecção se inicia no hospedeiro com a aspiração de leveduras desidratadas ou de basidiósporos, podendo o fungo se disseminar a partir do pulmão, ou não (Figura 1) (KWON-CHUNG *et al.*, 2014). As manifestações clínicas da doença são determinadas pela combinação entre o estado imune do hospedeiro e a espécie de *Cryptococcus* causadora da infecção (CHEN *et al.*, 2000), uma vez que *C. gattii* possui maior relação com os quadros pulmonares severos da criptococose, enquanto *C. neoformans* se relaciona mais com os quadros graves no SNC (NGAMSKULRUNGROJ *et al.*, 2012).

1.1.1. Patogênese e manifestações clínicas

Como dito acima, a criptococose geralmente se inicia após o hospedeiro inalar o fungo como levedura dissecada ou como esporo infectante, que germina quando se encontra nos alvéolos pulmonares, gerando as formas leveduriformes. Esta morfologia se mostra muito vantajosa no contexto da infecção, uma vez que facilita a

disseminação do patógeno pelo corpo do hospedeiro e auxilia na evasão do sistema imune, uma vez que as leveduras podem alterar a resposta microbida dos macrófagos do hospedeiro (ALVAREZ & CASADEVALL, 2006; CHARLIER *et al.*, 2009; TUCKER & CASADEVALL, 2002). Se encontrando neste local, *Cryptococcus* spp. é reconhecido pelo sistema imune do hospedeiro através dos macrófagos alveolares, que podem já conseguir eliminar o patógeno por fagocitose ou podem iniciar uma cadeia de resposta imune, recrutando outros leucócitos e provocando uma resposta com formação de grânulos inflamatórios (KWON-CHUNG *et al.*, 2014).

Em indivíduos imunocompetentes, essa resposta inicial é capaz de controlar a proliferação da levedura e finalizar a infecção neste mesmo órgão (Figura 1). Todavia, indivíduos com quadros de imunossupressão não são capazes de exterminar o fungo, permitindo a sobrevivência e a replicação deste naquele ambiente, causando quadros de pneumonia, e, em casos mais graves, formação de massas pulmonares e a síndrome do desconforto respiratório agudo (MAZIARZ & PERFECT, 2016; TAN *et al.*, 2021). Este quadro, se não tratado a tempo e apropriadamente, pode acarretar em quadros de fungemia – disseminação do patógeno através do sangue – e de infecções no SNC (Figura 1), que possuem altas taxas de mortalidade (NGAMSKULRUNGROJ *et al.*, 2012; RAJASINGHAM *et al.*, 2017; ZARAGOZA, 2019). Além desses quadros pulmonares, já foram descritos casos de infecções importantes por *C. neoformans* em outros órgãos, como a endocardite – infecção que afeta o coração (FOUNTAIN *et al.*, 2021, 1983; BLANC *et al.*, 1996; ALTIBI *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2020; MCGUIRE *et al.*, 2022).

As infecções criptocócicas no SNC, melhores representadas pelos quadros de meningite e meningoencefalite, se instalam após o patógeno atravessar a Barreira Hematoencefálica (BHE) do hospedeiro – característica importante para a patogênese da doença. Há três mecanismos descritos pelos quais o fungo é capaz de atravessar a BHE: (a) via transcitose, no qual o fungo, por engolfamento, penetra através das células endoteliais da barreira; (b) via paracelular, na qual o patógeno atravessa por entre as células, nas suas junções; e (c) via “Cavalo de Troia”, mecanismo no qual o fungo atravessa dentro dos macrófagos, sobrevivendo dentro dos fagossomos (KIM, 2006; SABIITI & MAY, 2012). Já no cérebro, o fungo pode se instalar nas meninges ou formar cistos que profundamente danificam os tecidos, causando aumento de

pressão intracraniana, perda de função e, frequentemente, morte (SABIITI & MAY, 2012; NGAMSKULRUNGROJ *et al.*, 2012).



Figura 1: Esquema que mostra a distribuição espacial de *C. neoformans* var. *grubii* e patogênese geral da criptococose. Observa-se a distribuição global do fungo, se encontrando naturalmente em ambientes como cascas de árvores, solo e guano de aves. A infecção se inicia com a aspiração deste microrganismo, que se instala nos alvéolos pulmonares. A partir deste momento, o patógeno é reconhecido e eliminado pelo sistema imune de um hospedeiro imunocompetente. Já em um hospedeiro imunodeficiente, não há a resolução da infecção nos pulmões e há o agravamento do quadro clínico.

1.2. *Cryptococcus neoformans*

O fungo *Cryptococcus neoformans* é uma levedura pertencente ao filo Basidiomycota, um grupo que divergiu dos organismos hoje classificados no filo

Ascomycota há cerca de 500 milhões de anos (HEITMAN *et al.*, 1999). Juntamente com *Cryptococcus gattii*, é amplamente estudado por serem, como já mencionado, os agentes etiológicos da criptococose – doença oportunista que causa um número significativo de mortes em pessoas imunodeficientes (NGAMSKULRUNGROJ *et al.*, 2012; RAJASINGHAM *et al.*, 2017; ZARAGOZA, 2019). Historicamente, as duas espécies eram consideradas uma só, por causarem a mesma doença e terem como características marcantes a presença de cápsula e as capacidades de melanização e de produção de urease, que as distinguiam de outras leveduras clínicas (KWON-CHUNG *et al.*, 2014). Todavia, após inúmeros estudos, elas foram distinguidas oficialmente no início dos anos 2000, com o reconhecimento da espécie *C. gattii* e a distinção de duas variedades de *C. neoformans*: *neoformans* e *grubii* (KWON-CHUNG *et al.*, 2002).

Com o avanço das técnicas laboratoriais, foram possíveis o estudo e a caracterização genética e molecular das espécies, permitindo classificações baseadas em quatro sorotipos (A, B, C e D) e em nove tipos moleculares principais: VNI, VNII, VNIII, VNIV e VNB para *C. neoformans* e VGI, VGII, VGIII e VGIV para *C. gattii*. Em 2019, um novo tipo molecular foi descoberto para *C. gattii*, chamado de VGV (FARRER *et al.*, 2019). Os sorotipos B e C estão relacionados à espécie *C. gattii*, enquanto, em *C. neoformans*, existem os sorotipos A, D e AD. A variedade *grubii* pertence ao sorotipo A (FRANZOT *et al.*, 1999) e possui os tipos moleculares VNI, VNII e VNB. Já a variedade *neoformans* se enquadra no sorotipo D (KWON-CHUNG *et al.*, 2014) e só possui o tipo molecular VNIV. O sorotipo AD, por sua vez, contém o tipo molecular VNIII e é constituído por híbridos estéreis das variedades A e D (KWON-CHUNG *et al.*, 2014).

Em 2015, uma nova classificação foi proposta com base na classificação molecular, separando *C. gattii* em cinco espécies e *C. neoformans* em duas. Dessa forma, *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A, tipos moleculares VNI, VNII e VNB) se chamaria apenas *C. neoformans*, *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D, tipo molecular VNIV) se chamaria *C. deneoformans* e o híbrido entre os sorotipos A e D (tipo molecular VNIII) se chamaria “híbrido *C. neoformans* X *C. deneoformans*” (HAGEN *et al.*, 2015). Entretanto, apesar de alguns trabalhos fazerem uso de tal proposta (FRANCISCO *et al.*, 2021; GAGO *et al.*, 2017), ela não foi bem aceita por

muitos especialistas (KWON-CHUNG *et al.*, 2017) e muitos permanecem seguindo o sistema baseado nos tipos moleculares de apenas duas espécies, o que se reflete, ainda hoje, em uma falta de consenso quanto à classificação mais correta, sendo necessários mais estudos e debates sobre este assunto.

Em vista disso, a classificação seguida por este trabalho se baseia na classificação que considera apenas duas espécies, uma vez que ele será realizado utilizando *C. neoformans* var. *grubii*, que possui o tipo molecular mais predominante na América Latina e no mundo: o VNI, relativo ao sorotipo A (FIRACATIVE *et al.*, 2021). Tal prevalência de VNI ocorre tanto em amostras ambientais, quanto em amostras clínicas, sendo o causador da criptococose em dos 76% casos diagnosticados (FIRACATIVE *et al.*, 2021). Apesar de o tipo molecular VNII já ter sido descrito como predominante em casos de pacientes portadores do HIV e que foram acometidos com meningoencefalite criptocócica (WIRTH *et al.*, 2018), o tipo VNI ainda se mostra como o mais recorrente em diversas regiões do Brasil, causando diversas mortes e estando intimamente relacionado com a AIDS e outras condições que levam à imunossupressão (FREIRE *et al.*, 2012; AGUIAR *et al.*, 2017; ANDRADE-SILVA *et al.*, 2018). Ademais, aproximadamente 95% dos casos de criptococose são causados por linhagens do sorotipo A, como *C. neoformans* var. *grubii*, enquanto o restante é causado por linhagens do sorotipo D e de *C. gattii* (MAZIARZ & PERFECT, 2016).

C. neoformans se apresenta, principalmente, como uma levedura, ou seja, como uma única célula globosa de tamanho variando entre 4 a 8 micrômetros (ZARAGOZA *et al.*, 2010). Esta é circundada por uma cápsula polissacarídica bem característica, que possui grande importância para a virulência do fungo (KOZEL & MASTROIANNI, 1976), e é constituída por glucuronoxilomanana e galactoxilomanana e, em menores porcentagens, manoproteínas, ácido hialurônico e ácido salicílico (CHERNIAK *et al.*, 1982; 1988; KWON-CHUNG *et al.*, 2014). Tal cápsula permanece ancorada na levedura pela parede celular de duas camadas, que é composta por quitina, quitosana, glucanos e glicoproteínas e que possui a função de proteção e de manutenção da permeabilidade e da forma celular (DOERING, 2009). Além disso, já foi relatado que a proporção entre quitina e quitosana é importante para a virulência de *C. neoformans* (UPADHYA *et al.*, 2021).

Ao longo do ciclo de vida, *C. neoformans* pode sair do estado morfológico de levedura, ao se reproduzir sexuadamente, já que este processo – que ocorre sob condições ambientais limitantes (KWON-CHUNG, 1976) e com a fusão de duas células de *mating types* distintos (MAT α e MAT a) – envolve a formação de um micélio dicariótico formado por hifas septadas e ansas, com posterior meiose e desenvolvimento de basídios e basidiósporos infectantes (KWON-CHUNG, 1976). Ademais, este fungo possui a capacidade de passar por um processo denominado frutificação monocariótica: um mecanismo considerado assexual, mas que, recentemente, foi proposto como sendo um tipo de reprodução sexual entre indivíduos do mesmo *mating type*, por também envolver, dentre outros processos, a produção de hifas e de esporos infecciosos capazes de iniciar a infecção no hospedeiro (LIN *et al.*, 2005; ZHAO & LIN, 2022). A reprodução assexuada, entretanto, é a que ocorre com mais frequência na espécie, seja no ambiente ou em hospedeiros (MAZIARZ & PERFECT, 2016). Tal reprodução se dá através de mitose, que se mostra como muito vantajosa durante o processo de infecção do hospedeiro, uma vez que é um processo rápido e permite a *C. neoformans* uma rápida colonização do ambiente.

Quanto à sua distribuição geográfica, *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) é encontrado em todo o mundo, enquanto a variedade *neoformans* (sorotipo D) é mais comum na Europa e as espécies de *C. gattii* são encontradas em regiões tropicais (MAZIARZ & PERFECT, 2016). Na natureza, seu ambiente habitual, *C. neoformans* é comumente encontrado em árvores (RANDHAWA *et al.*, 2005); ERGIN *et al.*, 2019) e associado a diversas aves, como pombos, especialmente ao seu guano (BAUWENS *et al.*, 1986; SWINNE-DESGAIN, 1975; AGHA KUCHAK AFSHARI *et al.*, 2012). O solo também é um habitat de frequente isolamento da espécie (EMMONS, 1951). Todavia, a presença do fungo neste ambiente pode ser resultado de contaminação causada pelas excretas das aves, uma vez que a levedura foi encontrada com mais frequência em solos onde há presença destes animais, como pombos e galinhas (AJELLO, 1958). Inicialmente, acreditava-se que as aves eram reservatórios deste patógeno, mas, pela presença do fungo no trato digestivo das aves e pelo fato de a temperatura corporal destas serem acima do suportado por este microrganismo, acredita-se que estes animais sejam apenas dispersores de *C. neoformans*, o transportando em seu trato digestivo, após a ingestão de alimentos contaminados (KHAN *et al.*, 1978). Dessa forma, este fungo ambiental, quando se comportando como patógeno oportunista, não

possui as aves como seus hospedeiros, podendo afetar, dentre outros, amebas e, claro, mamíferos (STEENBERGEN *et al.*, 2001; WIRTH *et al.*, 2018).

1.2.1. Genoma de *Cryptococcus* spp.

Diversos estudos têm sido feitos acerca do genoma de *C. neoformans* e *C. gattii* desde o surgimento de ferramentas para tal, o que possibilitou o mapeamento das sequências e análise do transcriptoma das distintas linhagens dessas espécies, bem como a comparação entre tais (HEITMAN *et al.*, 1999; LOFTUS *et al.*, 2005; D'SOUZA *et al.*, 2011). Estes trabalhos deram importantes passos na elucidação do genoma desses patógenos, assim como no esclarecimento da base genética de suas vias e dos seus fatores de virulência, oferecendo o alicerce para pesquisas futuras na mesma e em outras áreas.

De acordo com pesquisa de Janbon e colaboradores, publicada em 2014 e que sequenciou o genoma de *C. neoformans* var. *grubii* H99, a linhagem possui 6.962 genes codificantes, que representam 85% do total do genoma (JANBON *et al.*, 2014). Ademais, sabe-se que estes se encontram, juntamente com 1.359 genes não-codificantes, ao longo de 14 cromossomos e que eles codificam cerca de 9.189 transcritos, sendo que cerca de 22% de tais genes possuem múltiplas isoformas (ENA, 2014; SIEBER *et al.*, 2018). Ainda neste trabalho, notou-se que 21% do genoma dessa linhagem possui a capacidade de ser transcrito a partir das duas fitas, sendo possível a produção de mRNA com base tanto na fita de senso positivo, quanto na fita de senso negativo.

Ademais, foi reafirmado que a maioria dos genes possuem íntrons, sendo o número total 40.946 ao longo do genoma, e que a maioria se encontra em regiões codificantes – o que demonstra a forte presença de regiões intrônicas no genoma dessa espécie e que se reflete como uma enorme complexidade do seu transcriptoma (JANBON *et al.*, 2014), uma vez que os íntrons têm importante papel na regulação gênica (GOEBELS *et al.*, 2013; GONZALEZ-HILARION *et al.*, 2016). A presença frequente de íntrons se mostra como aspecto característico do genoma de diversas espécies fúngicas, estando, inclusive, diretamente relacionado com os ancestrais deste grupo (STAJICH *et al.*, 2007).

Em comparação com os éxons, de tamanho médio de 250 nucleotídeos (LOFTUS *et al.*, 2005), os íntrons da espécie costumam ser pequenos (KUPFER *et al.*, 2004), com cerca de 56 nucleotídeos, mas já foram documentados alguns com 2.124. Os íntrons presentes em regiões codificadoras tendem a ser menores (~55 nucleotídeos) do que aqueles presentes em regiões não codificantes (~59-65 nucleotídeos) (JANBON *et al.*, 2014). O gene com a maior quantidade de íntrons já registrado em *C. neoformans* possui 42 íntrons e codifica uma histidina quinase. Por outro lado, já foram identificados 35 genes expressos sem nenhum íntron em sua estrutura, em pelo menos uma condição, sendo 10 deles responsáveis por codificar proteínas exclusivas de *C. neoformans* (JANBON *et al.*, 2014).

1.3. Relação patógeno-hospedeiro

1.3.1. Sobrevivência no hospedeiro

Como mencionado anteriormente, *C. neoformans* é atacado pelo sistema imune, de forma que a sua sobrevivência também depende da sua patogenicidade, que envolve a capacidade de: (a) se adaptar às condições ambientais; (b) se evadir dos mecanismos imunes do hospedeiro e (c) produzir seus fatores de virulência (ZARAGOZA, 2019).

1.3.1.1. Adaptação ao ambiente e resposta a estresses

Quando no corpo de um hospedeiro, o patógeno necessita, inicialmente, se adaptar à todas as condições adversas e potencialmente estressantes presentes no ambiente, como o pH, a disponibilidade de nutrientes e a temperatura fisiológica do hospedeiro que, no caso dos humanos, varia entre 36°C e 37°C. Para tal, o fungo inicia modificações e regulações em diversos níveis, coordenadas pela sinalização intracelular, principalmente pelas vias envolvendo quinases, como a AMPc (proteína quinase A / AMP cíclico) e MAPK (proteína quinase C / proteína quinase ativada por mitógenos), pela proteína Ras, pela via UPR (*Unfolded Protein Response*), pela via cálcio-calcineurina e pelas cascatas de sinalização de lipídeos (KOZUBOWSKI *et al.*, 2009).

Além disso, estão presentes no ambiente moléculas de estresse oxidativo, como as espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (NOS), que possuem grande efeito negativo nas células de *C. neoformans*, devendo o fungo, portanto, ativar

enzimas protetoras, como superóxidos dismutases, por exemplo, através de vias de resposta a estresses, como HOG1 e Pkc1/Mpk1 (BROWN *et al.*, 2007; GERIK *et al.*, 2008). Inúmeros genes estão envolvidos nas atividades fisiológicas do patógeno quando este se encontra em seu ambiente natural e, com o objetivo de se manter tais atividades quando ele se encontra dentro de seu hospedeiro, todas as vias de respostas intracelulares devem culminar em regulações genéticas pré e pós transcricionais que levam à modificações bioquímicas e morfológicas no fungo.

1.3.1.2. Produção de fatores de virulência

Ademais às adaptações básicas, que devem ocorrer a todo o momento, o fungo pode apresentar ou produzir moléculas/características que são capazes de causar dano direto ao hospedeiro: os fatores de virulência (ZARAGOZA, 2019). Os quatro fatores de virulência mais estudados em *C. neoformans* são a termotolerância, a produção de melanina, a cápsula polissacarídica que envolve a célula e a produção e secreção de determinadas enzimas, como a urease (MAZIARZ & PERFECT, 2016).

A termotolerância é a capacidade de sobrevivência em temperaturas consideradas desfavoráveis a outros fungos. *C. neoformans*, é considerado termotolerante, assim como outros patógenos, por ser capaz de sobreviver no corpo de hospedeiros mamíferos, a cerca de 37°C, como mencionado anteriormente. A melanina, por sua vez, é considerada um fator de virulência muito importante por proteger ativamente o fungo de diversos agentes estressantes, como temperatura, luz UV, metais, ROS e até mesmo antimicrobianos (KWON-CHUNG *et al.*, 1982; NOSANCHUK & CASADEVALL, 2006). Este pigmento é produzido pelo fungo através de uma enzima específica e a partir da conversão de compostos difenólicos, o que poderia explicar o tropismo do fungo pelo SNC, uma vez que lá existe grande concentração desses compostos, como L-DOPA (MAZIARZ & PERFECT, 2016). Há, ainda, pesquisas que indicam que *C. neoformans* pode produzir diferentes tipos de melanina durante infecções, a depender da composição das moléculas precursoras (catecolaminas) utilizadas (BAKER *et al.*, 2022).

Assim como a melanina, a cápsula polissacarídica se mostra como uma barreira protetora contra agentes estressantes (ZARAGOZA *et al.*, 2008). Porém, composta principalmente por glucuronoxilomanana (GXM) e galactoxilomanana (GalXM)

(CHERNIAK *et al.*, 1982; 1988), ela possui significativa relevância para a virulência de *C. neoformans* por interferir e/ou impedir diretamente a ação de determinadas células e mecanismos imunes do hospedeiro (RICARDO *et al.*, 2019). Além de inibir fisicamente a fagocitose por encobrir os antígenos de superfície que seriam reconhecidos pelas células fagocíticas do hospedeiro (KOZEL & MASTROIANNI, 1976), os polissacarídeos presentes na cápsula, em especial o GXM, são reconhecidos por sua interferência na migração e na adesão de neutrófilos, dentre outros mecanismos (DONG & MURPHY, 1993; ELLERBROEK *et al.*, 2002). Outras ações dos polissacarídeos de *C. neoformans* nas células imunes do hospedeiro dizem respeito à indução de apoptose em macrófagos, inibição de certas quimiocinas e da proliferação de linfócitos (CHIAPELLO *et al.*, 2004). A ação da cápsula como fator de virulência é tão essencial neste patógeno, que a falta dessa estrutura causa perda total da virulência (CHANG & KWON-CHUNG, 1994).

A produção de determinadas enzimas também se constitui como um notável fator de virulência de *C. neoformans*: a urease, por exemplo, age degradando ureia em amônia e gás carbônico, modificando o pH dentro do fagolisossomo, auxiliando na sobrevivência do patógeno dentro dos macrófagos e promovendo a exocitose não-lítica, o que facilita a dispersão criptocócica pelo corpo do hospedeiro e sua entrada no SNC (FU *et al.*, 2018); já as fosfolipases possuem papel mais ativo na hidrólise da membrana plasmática das células do hospedeiro, o que permite a penetração do microrganismo, e, também, na sobrevivência do patógeno dentro do macrófago, através da incorporação de ácido araquidônico nos lipídeos criptocócicos (CHEN *et al.*, 1997; WRIGHT *et al.*, 2007).

1.3.1.3. Evasão do sistema imune

Outrossim, o patógeno deve ser capaz de escapar do sistema imune do hospedeiro, pois, mesmo que este possua algum tipo de imunodeficiência, este sistema será ativado na presença do microrganismo. E, ao longo de sua evolução, *C. neoformans* desenvolveu dois mecanismos principais de evasão do sistema imune: a habilidade de modificar sua morfologia e de se comportar como patógeno intracelular facultativo, sobrevivendo dentro dos macrófagos, principalmente com o auxílio dos fatores de virulência supracitados (ZARAGOZA, 2019).

Como dito anteriormente, a cápsula que envolve a célula criptocócica pode impedir a fagocitose, principalmente por ser uma barreira física. Contudo, em casos em que há a presença de anticorpos e proteínas do sistema complemento, este processo ocorre (ZARAGOZA, 2019) e, a fim de sobreviver, o fungo necessita escapar. Para tal, ele se comporta como um patógeno intracelular facultativo, sendo capaz de sobreviver e de se replicar no fagolisossomo através da ação de seus fatores de virulência: a cápsula polissacarídica, que o protege fisicamente o fungo dos radicais livres ali presentes, e enzimas como a urease, que quebra ureia em amônia, produzindo íons que aumentam o pH intracelular e, assim, levam à diminuição da taxa de replicação do fungo – que leva à um estado quase quiescente do patógeno e à uma maior persistência deste no ambiente (CHEN *et al.*, 1997; WRIGHT *et al.*, 2007; FU *et al.*, 2018; ZARAGOZA *et al.*, 2008).

Outro mecanismo de evasão imune apresentado pelas células de *C. neoformans* é relacionado à mudanças fenotípicas em si mesmo e na sua cápsula (ZARAGOZA, 2019). As mudanças na morfologia celular se mostram através da formação de hifas e pseudohifas – que contribuem na adesão e disseminação do patógeno pelo organismo do hospedeiro – e do aumento celular e capsular (ZARAGOZA *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2012). Presumidamente com o objetivo de prolongar a sobrevivência do patógeno no hospedeiro, evitando a fagocitose e o reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro, e sendo barreira espessa de proteção contra agentes estressantes, tal aumento do corpo celular e da cápsula polissacarídica pode resultar em células de 40 a 60 milímetros de diâmetro, as chamadas células titãs, características e frequentes durante as infecções, pela sua relevância na virulência (ZARAGOZA *et al.*, 2010).

1.3.2. O transcriptoma de *C. neoformans* durante a infecção

Desde a criação de técnicas de que permitiram a realização de análises do transcriptoma, estas têm sido feitas com os mais diversos organismos, inclusive com *C. neoformans* durante o processo infeccioso (RUDE *et al.*, 2002; STEEN *et al.*, 2003; HU *et al.*, 2008; FREITAS *et al.*, 2022). Tais análises são de extrema relevância para se compreender o comportamento do microrganismo ao decorrer da infecção, o que auxilia na elucidação da patogênese da criptococose e pode gerar novas possibilidades de tratamento.

A partir dos trabalhos que expõe os perfis de expressão dos genes do patógeno ao longo da doença, foram reveladas vias importantes para a sobrevivência e crescimento do patógeno no corpo do hospedeiro. Assim que entra no ambiente alveolar, o fungo já encontra um ambiente desfavorável à sua sobrevivência, uma vez que há uma limitação de nutrientes – principalmente de glicose. Congruente com esta informação, o que se observa nos estágios iniciais de infecção é um aumento dos transcritos provenientes de genes envolvidos em vias alternativas de utilização de carbono, como o ciclo do glioxilato, degradação de ácidos graxos e a gliconeogênese, justamente para suprir a necessidade do microrganismo (RUDE *et al.*, 2002; HU *et al.*, 2008). Outros genes regulados positivamente se relacionam com a biossíntese ribossomal, com resposta à estresses e à transportadores, como o CTR4, que já foram relatados com alta expressão em células de *C. neoformans* provenientes do fluido cérebro-espinhal, bem como do ambiente pulmonar (STEEN *et al.*, 2003; WATERMAN *et al.*, 2007; HU *et al.*, 2008; FREITAS *et al.*, 2022).

Em contrapartida aos genes regulados positivamente, genes relacionados à produção de energia constam como regulados negativamente no início da infecção – provavelmente pelo processo de adaptação inicial pelo qual o fungo passa ao longo das primeiras horas (FREITAS *et al.*, 2022). Já em estágios mais tardios de criptococose, as análises de transcriptoma tendem a revelar maiores taxas de transcritos relacionados à produção de energia e à maquinaria de *splicing* – apesar de ainda não se conhecer as razões para as maiores taxas deste último, sendo necessários experimentos a fim de elucidar esta questão. Além disso, transcritos envolvidos na produção de cápsula, um dos fatores de virulência mais importantes de *C. neoformans*, também se encontram em maiores taxas em tempos tardios de infecção criptocócica (WANG *et al.*, 2021; FREITAS *et al.*, 2022).

Apesar de estarem se tornando cada vez mais frequentes e de fornecerem informações preciosas sobre o metabolismo de *C. neoformans* no contexto de infecções recentes e tardias (HU *et al.*, 2008; FREITAS *et al.*, 2022), as análises de transcriptoma que analisam apenas a expressão diferencial de genes ainda não são capazes de explicar por completo os processos biológicos necessários ao patógeno para sobreviver no corpo do hospedeiro. Tal falta de elucidação completa acontece, em parte, por tais análises não serem capazes de abranger os mecanismos de

regulação que fazem com que certos genes apresentem taxas maiores ou menores de expressão em determinadas condições – regulação, esta, muito realizada através de um mecanismo exclusivo de eucariotos: o *splicing* alternativo.

1.4. *Splicing* Alternativo (AS)

O conceito de processamento alternativo ou *splicing* alternativo (AS) surgiu em 1980, poucos anos após o estabelecimento do conceito original de *splicing*. Neste ano, Early e colaboradores fizeram a descoberta de que dois mRNAs podiam ser produzidos a partir de um mesmo gene de imunoglobulina, por meio da inclusão – ou não – de um dos éxons do gene (EARLY *et al.*, 1980). Desde então, inúmeras pesquisas têm sido realizadas, o que nos permitiu alcançar importantes descobertas e compreender a essencialidade deste processo, exclusivo de eucariotos (KIM *et al.*, 2007).

Tanto o *splicing* convencional quanto o alternativo ocorrem durante o processo de maturação de um pré-mRNA derivado de um gene que contém mais de um éxon (LE *et al.*, 2015). Todo o processo é coordenado e realizado pelo spliceossomo – um complexo composto por RNAs não codificantes (snRNAs – *small nuclear RNAs*) e por cerca de 150 proteínas (ULE & BLENCOWE, 2019) – que se liga nos chamados sítios de *splicing* do mRNA e catalisa o processo. Tais sítios são reconhecidos com base nas diferenças entre o conteúdo GC do gene, que são determinantes, também, para a distinção entre éxons e íntrons (AMIT *et al.*, 2012).

Durante um processamento ou *splicing* regular, o pré-mRNA – que é resultado do processo de transcrição – é cortado de forma que permita a exclusão de regiões chamadas íntrons e a união e permanência de regiões chamadas de éxons, que são aquelas que propriamente codificam os aminoácidos que formam as proteínas, após a tradução (GILBERT, 1978). Desta maneira, o resultado de um *splicing* regular é um mRNA maduro, que contém apenas a sequência relativa à todos os éxons do seu respectivo gene, necessária à formação de uma proteína.

O *splicing* alternativo (AS) ocorre quando o spliceossomo reconhece sítios alternativos de *splicing* nos éxons (KELEMEN *et al.*, 2013), em resposta a diversos estímulos. Nesses casos, o pré-mRNA também é segmentado e alguns segmentos são extraídos, enquanto outros são unidos. Porém, o processo ocorre de forma distinta

ao *splicing* regular, tendo cinco padrões observados com maior frequência (Figura 2): **(a)** Retenção de íntrons (IR, do inglês, *Intron Retention*), em que um íntron permanece no mRNA após o *splicing*; **(b)** Sítio alternativo de *splicing* 5' (A5'SS, do inglês *Alternative 5' Splice Site*), caso em que o *splicing* para separar as sequências intrônicas e exônicas acontece em um sítio 5' distinto no éxon, modificando a sequência final que estará no mRNA **(c)** Sítio alternativo de *splicing* 3' (A3'SS, do inglês *Alternative 3' Splice Site*), que possui o mesmo caso do padrão anterior, mas o sítio alternativo é 3'; **(d)** Uso alternativo de éxon (ES, do inglês, *Exon Skipping*), em que um éxon pode, ou não, ser incorporado no mRNA; **(e)** Éxons mutuamente excludentes (MXE, do inglês, *Mutually Exclusive Exons*), em que um éxon de um gene só é observado quando um outro não está, e vice-versa (LE *et al.*, 2015).

Através desse mecanismo, portanto, é possível a obtenção de diferentes mRNAs – isoformas – a partir de um mesmo gene, o que permite a produção de diferentes proteínas a partir de um único gene, chamadas de proteoformas (SMITH & KELLER, 2013). Por este motivo, o AS, quando ocorrido, é causa de aumento na diversidade do transcriptoma e, conseqüentemente, do proteoma do organismo (BLACK, 2003).

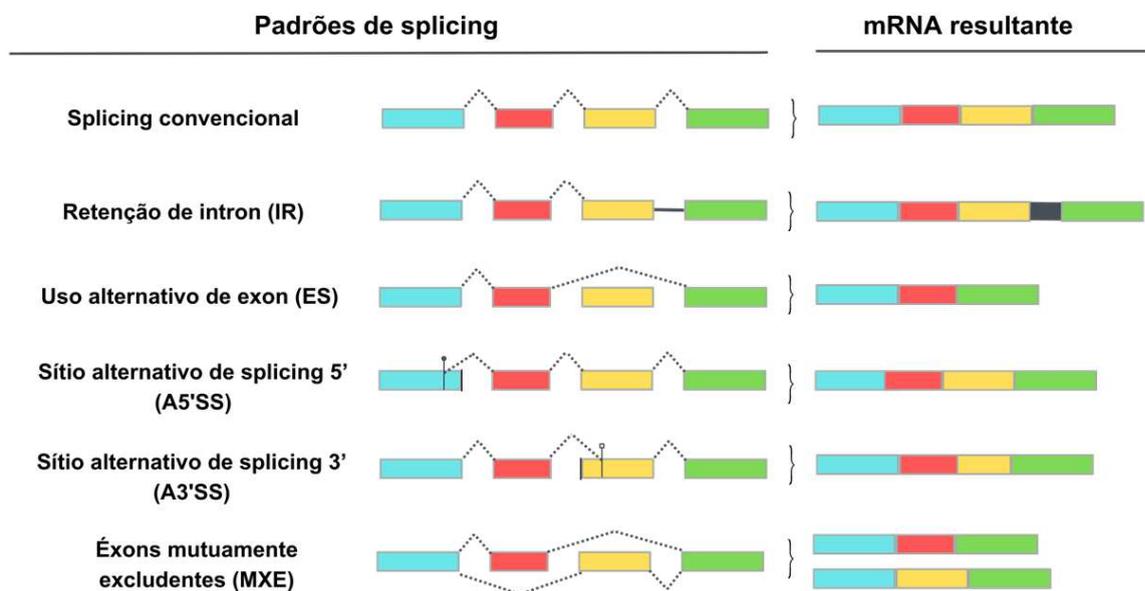


Figura 2: Padrões de *Splicing* Alternativo mais comuns. Observa-se a representação gráfica de: Retenção de íntrons, Uso alternativo de éxons, Sítio alternativo de *splicing* 5', Sítio

alternativo de splicing 3' e Éxons mutuamente excludentes, bem como seus mRNAs resultantes.

O *splicing* alternativo é muito recorrente nos genes de *C. neoformans* e se mostra como um mecanismo de regulação de expressão gênica diretamente influenciado pelo ambiente em que o fungo se encontra (GOEBELS *et al.*, 2013; GONZALEZ-HILARION *et al.*, 2016). Na linhagem *C. neoformans* var. *grubii* já foram identificados 741 genes capazes de produzir mais de um transcrito, sendo que 10% deles sofrem processamentos alternativos dos tipos ES, IR, A5S ou A3S, sendo que a retenção de íntrons é o tipo mais comum de AS ocorrido na espécie (JANBON *et al.*, 2014) – fato que condiz com o que se observa em outros fungos e em outras espécies e linhagens de *Cryptococcus* (LOFTUS *et al.*, 2005; GONZALEZ-HILARION *et al.*, 2016). Ainda nesta espécie, já se sabe que os sítios de *splicing* mais frequentes são o GT-AG e o GC-AG, sendo o primeiro utilizado cerca de 97% das vezes e o segundo cerca de 2%, tanto em condições de estresse quanto em condições de controle (SIEBER *et al.*, 2018).

1.4.1. Importância do processo

Sabe-se que as diversas condições fornecidas pelo meio extracelular têm a capacidade de influenciar os seres vivos e que, juntamente com sinalizações intracelulares (SHIN & MANLEY, 2004; LYNCH, 2007), promovem respostas e mudanças, dentre outras, estruturais e metabólicas, que têm a finalidade de possibilitar a sobrevivência desses seres no ambiente em que se encontram, sendo estes seres microrganismos ou mamíferos em condição de infecção (NEVES-DA-ROCHA *et al.*, 2019; FELDMESSER *et al.*, 2000). Tais mudanças metabólicas ocorrem por meio do controle da expressão gênica, que, após a transcrição, se dá, principalmente, pelo processamento dos transcritos, ou seja, através do *splicing* e do *splicing* alternativo (LEAL *et al.*, 2009; MENDES *et al.*, 2016), sendo comprovado em *T. rubrum* que, até mesmo genes importantes para a ativação do spliceossomo, como o *prp4*, podem ser modulados em resposta ao crescimento na presença de queratina – um meio adequado para o crescimento desse fungo dermatófito (BITENCOURT *et al.*, 2019).

Os padrões de *splicing* apresentam grande flexibilidade molecular e genética, se alterando de acordo com as condições ambientais às quais o ser vivo é submetido e de forma a permitir que este responda propriamente e se adapte. Além de aumentar a diversidade de mRNA e do proteoma do organismo, pode-se citar como efeito do AS, a sua ação direta na estabilidade do mRNA, além da sua influência nas proteínas, que podem ter suas características enzimáticas, de ligação e de localização intracelular alteradas através desse processo (KELEMEN *et al.*, 2013). Ademais, eventos de AS também podem ocorrer nos RNAs não codificantes (ncRNAs), que não codificam proteínas, mas que atuam de modo direto na modulação da transcrição e de processos pós-transcricionais – através de mecanismos como o Complexo de Silenciamento Induzido por RNA (RISC), por exemplo, que degrada mRNAs a depender de estímulos específicos e influencia na sua expressão (HASHIMOTO *et al.*, 2009; BARTEL, 2004; JIANG *et al.*, 2012) – o que pode influenciar muito no fitness do organismo.

Normalmente, os efeitos do AS não ultrapassam os níveis proteicos, podendo, inclusive, não ter efeito algum no proteoma (CHEN *et al.*, 2007). Entretanto, em alguns casos, os efeitos podem alcançar maiores escalas, agindo sob a sobrevivência da célula, principalmente por meio de toda a cadeia regulatória que o AS proporciona (KELEMEN *et al.*, 2013), que varia desde a ação simples nas propriedades das proteínas, até a influência na transcrição através dos ncRNAs supracitados. Todavia, apesar de ter-se consciência de todos estes papéis e consequências do AS, a função das isoformas sempre é dependente do organismo na qual o AS ocorre (CALDAS *et al.*, 2007), uma vez que, nas espécies, existem especificidades genômicas e bioquímicas que respondem de maneira distinta ao AS – o que gera a necessidade de estudo dos papéis do processamento alternativo de forma particular.

2. JUSTIFICATIVA

Causada por dois patógenos distintos capazes de afetar indivíduos imunocomprometidos e imunocompetentes – *C. gattii* e *C. neoformans* – a criptococose é uma doença ainda negligenciada, apesar de ser responsável por grande taxas de mortalidade ao redor do mundo – 41% a 61%, especialmente por meio de seu quadro encefálico (NGAMSKULRUNGROJ *et al.*, 2012; PARK *et al.*, 2009; RAJASINGHAM *et al.*, 2017). Muito associada com quadros de

imunodeficiência, a doença se tornou mais frequente e preocupante após a emergência da AIDS e do HIV (ZARAGOZA, 2019). Entretanto, mesmo após anos de aplicação de terapias e com o controle da disseminação do HIV, as mortes por infecções criptocócicas ainda se mostram muito comuns (BOGAERTS *et al.*, 1999; LIU *et al.*, 2012; WHO FPPL, 2022).

A relevância da doença se revela ostra ainda mais quando se considera a mais recente Lista de Patógenos Fúngicos Prioritários (FPPL), organizada pela Organização Mundial de Saúde (WHO) em 2022, que categorizou *C. neoformans* como o patógeno de maior prioridade dentre os 19 que entraram na lista. Isso significa que, considerando critérios como: taxa de mortalidade, resistência à antifúngicos e incidência anual, dentre outros, *C. neoformans* apresenta alta periculosidade para a espécie humana – o que demonstra a importância de se estudar os mecanismos moleculares pelos quais este patógeno consegue se adaptar e sobreviver no corpo do hospedeiro.

Recentemente, têm se notado a importância de se estudar padrões de AS em complemento aos estudos de expressão diferencial dos genes (SIEBER *et al.*, 2018), uma vez que o processo de AS é um importante mecanismo de regulação pós-transcricional da expressão gênica em eucariotos (GOEBELS *et al.*, 2013; GONZALEZ-HILARION *et al.*, 2016). Apesar de menos frequente comparado a outros eucariotos, o mecanismo de AS é frequente dentre os fungos (WANG *et al.*, 2010, XIE *et al.*, 2015), sendo ainda mais frequente entre os patógenos (GRÜTZMANN *et al.*, 2014), como *C. neoformans*. Tal fato é condizente com o nicho desta espécie, uma vez que o AS é uma rápida e importante ferramenta de alteração da maquinaria genética, que pode ser ativada a fim de promover rápida adaptação ao ambiente hostil e estressante (SCHREIBER *et al.*, 2015) que é o corpo do seu hospedeiro, ao influenciar diretamente a expressão e função dos genes (IRIMIA *et al.*, 2012; KALSOTRA & COOPER, 2012), podendo afetar diretamente os fatores de virulência do patógeno (GRÜTZMANN *et al.*, 2014).

A linhagem H99 de *Cryptococcus neoformans* (sorotipo A) tem sido bastante utilizada nos estudos envolvendo os aspectos genéticos e moleculares da espécie, especialmente por sua maior virulência – em comparação com outras linhagens – e por sua alta incidência, dado que mais de 95% dos casos de criptococose são

causados por *C. neoformans* var. *grubii* (JANBON *et al.*, 2014). Nessa espécie, inclusive, já foi detectada uma alta frequência de eventos de AS em diversos genes, sendo o padrão mais comum a retenção de íntrons (IR) (GONZALEZ-HILARION *et al.*, 2016). Apesar disso, foi demonstrado que a IR não causa altos impactos no proteoma da espécie, mas aumenta substancialmente a expressão dos genes, podendo promover maior adaptação da levedura ao seu ambiente (GONZALEZ-HILARION *et al.*, 2016).

A técnica de RNA-seq de múltiplos organismos tem sido amplamente utilizada para auxiliar no entendimento de processos e mecanismos ocorridos durante o processo infeccioso – tanto daqueles relacionados ao patógeno, quanto daqueles relacionados ao hospedeiro – por permitir o acesso ao transcriptoma destes dois organismos ao mesmo tempo. O trabalho de Seelbinder e colaboradores é um que faz uso desta técnica, uma vez que, nele, foi realizado um RNA-seq triplo a partir de um sistema de coinfeção de *Aspergillus fumigatus* e citomegalovírus humano em cultura celular de monócitos derivados de células dendríticas (SEELBINDER *et al.*, 2020). Trabalhos como este, apesar de fornecerem valiosas informações sobre os mecanismos imunológicos envolvidos na resposta mútua contra os patógenos no sistema de coinfeção, apresentam limitações, uma vez que são realizados utilizando-se cultura celular, o que impede o alcance da complexidade real dos diversos processos e interações ocorridos durante o processo infeccioso verdadeiro.

Por outro lado, há trabalhos que investigam o transcriptoma durante o processo infeccioso, como o de Hailong e colaboradores, que consistiu na condução e comparação de dois RNA-seq duplo de *C. neoformans*, sendo o primeiro realizado com o fungo causando infecção no hospedeiro primata não-humano *Macaca fascicularis*, e o segundo em hospedeiro murino (LI *et al.*, 2019). Entretanto, nesta pesquisa, não foi dado enfoque na resposta do fungo com relação à sua importante regulação gênica promovida pelo *splicing* alternativo, uma vez que as análises foram somente sobre expressão diferencial de genes. Da mesma maneira, o trabalho de Freitas e colaboradores (2022) realizou análises de expressão diferencial de *C. neoformans* entre distintos momentos de infecção em modelo murino, contudo o processo de *splicing* alternativo não foi avaliado (FREITAS *et al.*, 2022).

Desta forma, embora já haja relatos de trabalhos investigando o padrão de *splicing* alternativo em patógenos durante infecções, como o de Ibrahim e colaboradores, realizado com o fungo patógeno de plantas *Sclerotinia sclerotiorum* durante a infecção em diversos de seus hospedeiros vegetais (IBRAHIM *et al.*, 2020), observa-se na literatura uma carência de estudos focados no perfil de AS de *C. neoformans* durante a infecção em um hospedeiro murino, que, através de uma resposta imune, fornece um ambiente inconstante e repleto de elementos nocivos ao fungo. Em virtude disso, este trabalho buscou identificar os padrões de AS nos genes expressos por *C. neoformans* durante a infecção em modelo murino. Este tipo de investigação possui ampla relevância e ineditismo, principalmente por ser realizada a partir de um transcriptoma obtido de um RNAseq duplo entre patógeno e hospedeiro, gerado a partir de processo infeccioso em estágios inicial e tardio em um modelo animal mamífero – o que implica em maior proximidade com os processos ocorridos durante a progressão da criptococose em seu hospedeiro humano e, conseqüentemente, em maior confiabilidade na extrapolação dos resultados para compreender a doença no hospedeiro humano.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Analisar a ocorrência, o perfil e o papel do *splicing* alternativo em genes expressos por *C. neoformans*, após 6 horas e 10 dias de infecção em hospedeiro murino experimental, comparado ao controle em meio de cultura YPD.

3.2. Objetivos específicos

In silico

- A partir de dados de RNA-seq duplo de dois momentos de infecção (6 horas e 10 dias) e do controle (YPD):
 - Distinguir, identificar e caracterizar os genes de *C. neoformans* que apresentam uso diferencial de éxons (*Differential Exon Usage* - DEU) em três comparações: 6 horas versus YPD (6h vs. YPD), 6 horas versus 10 dias (6h vs. 10d) e 10 dias versus YPD (10d vs. YPD);
 - Distinguir, identificar e caracterizar os genes de *C. neoformans* que apresentam *splicing* alternativo diferencial (*Differential Alternative*

Splicing - DAS) em três comparações: 6h vs. YPD, 10d vs. YPD e 6h vs. 10d, bem como identificar quais os tipos de AS ocorridos;

- Investigar os papéis dos genes que apresentam DAS e expressão diferencial simultaneamente nas mesmas condições, de forma a inferir o papel dos AS no desenvolvimento da infecção.

4. METODOLOGIA

4.1. Linhagem de *Cryptococcus*, cultivo e manutenção

Neste trabalho, foi utilizada a espécie de origem clínica *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* linhagem H99 (ATCC® 208821™), sorotipo A, de Nova York. As amostras são mantidas a -80°C e, após descongelamento, a linhagem foi repicada em meio YPD sólido e cultivada *overnight*, por 48h a 37°C. O meio YPD é composto por 1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de D-glicose e 2% de ágar e tem pH de 6 a 7 quando a 25°C, se mostrando como um meio extremamente rico para o crescimento da levedura.

4.2. Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado a partir da retirada das células diretamente das placas de cultivo YPD *overnight*. As células foram lavadas duas vezes e suspensas em solução salina estéril 0,85%, homogeneizadas e, então, coradas com azul de tripan (*Trypan Blue* – Sigma Aldrich), para que fosse possível contabilizar as células viáveis em Câmara de Neubauer. Posteriormente, a amostra foi normalizada via suspensão em PBS 1X para que houvesse 1×10^6 células viáveis de *C. neoformans* H99 em 40µl de inóculo.

4.3. Experimento em modelo murino

Para o estudo da influência do ambiente do corpo do hospedeiro no processamento dos genes de *C. neoformans*, 24 camundongos machos C57BL/6 de 6 a 8 semanas de idade foram utilizados, de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brasil (Protocolo 306/2015) e todos os experimentos animais foram realizados de acordo

com guias para tratamento ético de animais dentro da Lei Federal Brasileira 11.794 e de forma que o sofrimento animal foi minimizado. Os animais foram divididos em grupos de seis por gaiola, os ciclos de claro/escuro foram mantidos e água e ração foram fornecidos *ad libitum*, assim como descrito no trabalho de Freitas e colaboradores (FREITAS *et al.*, 2022).

4.3.1. Infecção intratraqueal

Para a infecção, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cetamina (80 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg) em PBS e, em seguida, foi realizado, em cada animal, o inóculo de 40µl da suspensão com 1×10^6 de *C. neoformans* H99 previamente preparada, via intratraqueal. Os animais foram acompanhados até sua eutanásia, que ocorreu 6 horas após o início da infecção, para metade deles (n=12), e 10 dias após, para a outra metade (n=12).

4.3.2. Coleta do lavado broncoalveolar (BAL)

A fim de obter as células do fungo e do camundongo durante o processo de infecção, foi realizada a coleta do lavado broncoalveolar em 12 animais, após 6 horas de infecção, e aos 10 dias, nos outros 12 animais utilizados no estudo. Para cada tempo (6 horas e 10 dias) os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos de 6, de forma que cada um desses grupos de 6 camundongos constituísse uma réplica. Sendo assim, em cada um dos tempos estudados, existem duas réplicas formadas, cada uma, pela mistura do BAL de 6 camundongos independentes (Figura 3).

O procedimento de coleta do BAL foi executado cirurgicamente com exposição traqueal e injeção lenta de 1 ml de PBS gelado nos pulmões dos animais, via cateter plástico de 0,8 mm, seguida de três retiradas desta solução pelo mesmo cateter. Todo o procedimento foi realizado com os animais sob anestesia, nos mesmos padrões éticos citados acima e os animais foram eutanasiados posteriormente em câmara de CO₂, de forma humanitária e de acordo com regras e recomendações. Por haver duas réplicas para cada tempo, formadas pelo *pool* de amostras de 6 animais distintos, o BAL recolhido dos animais de cada grupo foi combinado, centrifugado, corado com Azul de tripan e, posteriormente, contado em Câmara de Neubauer, para que fosse ajustado a 1×10^6 células de *C. neoformans* em solução final. O líquido resultante do

processo foi congelado a -80°C até ser analisado. Todo o processo de experimentação animal está representado esquematicamente na Figura 3.

4.3.3. Condição controle

A condição controle (chamada de YPD durante as análises) foi realizada somente para *C. neoformans*, consistindo no cultivo do fungo em meio YPD (1% extrato de levedura, 1% peptona e 2% dextrose) a 37°C , por dois ciclos *overnight* (48h) (Figura 3). Este é o procedimento padrão para a realização de um inóculo, contudo, após este período, as células fúngicas foram recolhidas para a extração do RNA e, antes de serem congeladas a -80°C e analisadas, passaram por um processo de contagem e normalização até se obter uma solução com 1×10^6 células de *C. neoformans*, assim como realizado com as células contidas no BAL.

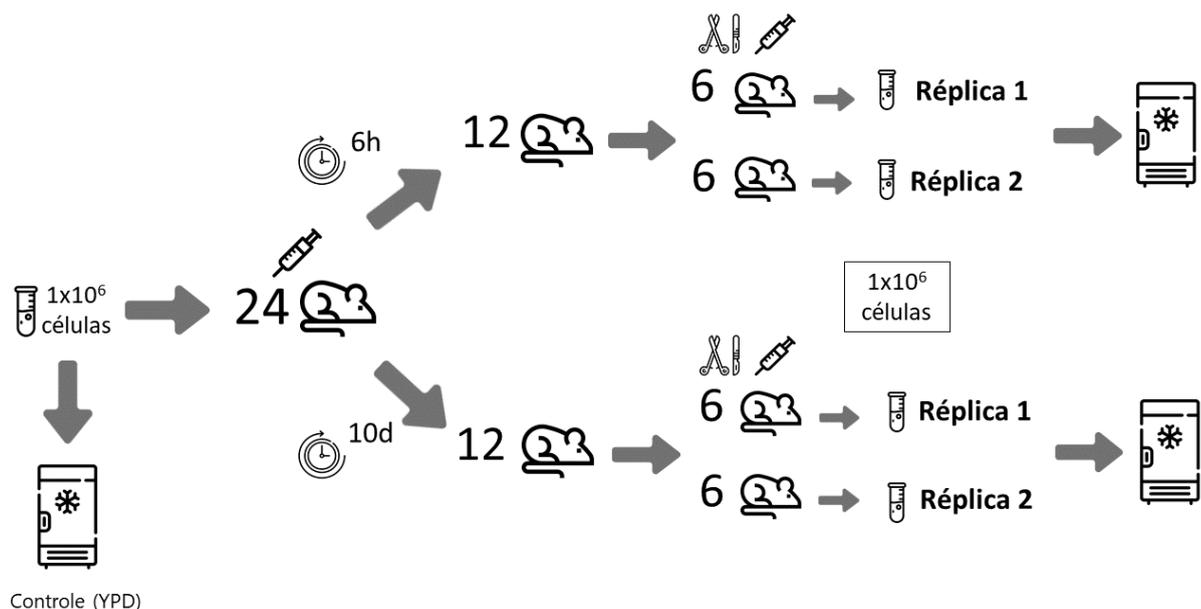


Figura 3: Esquema da metodologia realizada para a obtenção das células de *C. neoformans* durante a infecção e controle. O lavado broncoalveolar (BAL) dos animais foi obtido em estágios inicial e tardio da infecção (6 horas e 10 dias após a infecção intratraqueal), para a obtenção das células do patógeno e posterior extração do RNA.

4.4. Extração e mapeamento do RNA

As células de *C. neoformans* cultivadas nas condição de controle e as duas réplicas de cada tempo (6 horas e 10 dias) do BAL contendo células do fungo e

também do seu hospedeiro *M. musculus* foram enviadas congeladas a -80°C para a empresa GENEWIZ, para que fosse realizada a extração do RNA e o seu sequenciamento para as duas espécies distintas via depleção de rRNA (HiSeq paired end 150bp – Illumina), de acordo com bibliotecas de cDNA, gerando arquivos do tipo FASTQ – que contém as sequências biológicas de interesse, bem como seus scores de qualidade. A qualidade do sequenciamento das amostras foi, então, analisada através do programa FastQC (ANDREWS, 2010).

Após o sequenciamento, o programa STAR v.2.7.10b foi usado para indexação do genoma e mapeamento dos reads. Dessa forma, inicialmente foi realizada a etapa de indexação do genoma de referência, de nome “Cryptococcus_neoformans_var_grubii_h99_gca_000149245.CNA3.dna.toplevel.fa.gz”, disponível no ENSEMBL (https://fungi.ensembl.org/Cryptococcus_neoformans_var_grubii_h99_gca_000149245/Info/Index) com o arquivo de anotação GTF “Cryptococcus_neoformans_var_grubii_h99_gca_000149245.CNA3.55.gtf”, através da linha de comando a seguir:

```
STAR --runThreadN 1 --runMode genomeGenerate --genomeDir
Cneoformans_H99_INDEX --genomeFastaFiles
Cryptococcus_neoformans_var_grubii_h99_gca_000149245.CNA3.dna.toplevel.fa
--sjdbGTFfile
Cryptococcus_neoformans_var_grubii_h99_gca_000149245.CNA3.55.gtf >
log_STAR_H99.txt
```

Então, também através do STAR v.2.7.10b (DOBIN *et al.*, 2013) – que detecta as junções do genoma que são sítios de *splicing*, as une e, assim, alinha as sequências –, foi realizado, separadamente para cada espécie – patógeno *C. neoformans*, e hospedeiro *Mus musculus* – o mapeamento das sequências resultantes do sequenciamento (FASTQ) com o resultado da etapa anterior (genoma de referência indexado), utilizando as linhas de comando a seguir:

- Mapeamento o YPD1 (1ª replicata da condição controle):

```
STAR --outSAMattributes All --outSAMtype BAM SortedByCoordinate --quantMode
GeneCounts --sjdbGTFfile Cneoformans-grubii_H99_genome_MAR-
2023/Cryptococcus_neoformans_var_grubii_h99_gca_000149245.CNA3.55.gtf --
outReadsUnmapped Fastx --genomeDir Cneoformans-grubii_H99_genome_MAR-
2023/Cneoformans_H99_INDEX/ --readFilesIn Transcriptoma_Gustavo-
Barbara/00_fastq/YPD1C_R1_001.fastq Transcriptoma_Gustavo-
Barbara/00_fastq/YPD1C_R2_001.fastq --outFileNamePrefix ypd1 >
log_STARmapping_ypd1.txt
```

- Mapeamento do YPD2 (2ª replicata da condição controle):

```
STAR --outSAMattributes All --outSAMtype BAM SortedByCoordinate --quantMode
GeneCounts --sjdbGTFfile Cneoformans-grubii_H99_genome_MAR-
2023/Cryptococcus_neoformans_var_grubii_h99_gca_000149245.CNA3.55.gtf --
outReadsUnmapped Fastx --genomeDir Cneoformans-grubii_H99_genome_MAR-
2023/Cneoformans_H99_INDEX/ --readFilesIn Transcriptoma_Gustavo-
Barbara/00_fastq/YPD2C_R1_001.fastq Transcriptoma_Gustavo-
Barbara/00_fastq/YPD2C_R2_001.fastq --outFileNamePrefix ypd2 >
log_STARmapping_ypd2.txt
```

- Mapeamento do BAL 6h1 (1ª replicata da condição de infecção às 6 horas):

```
STAR --outSAMattributes All --outSAMtype BAM SortedByCoordinate --quantMode
GeneCounts --sjdbGTFfile Cneoformans-grubii_H99_genome_MAR-
2023/Cryptococcus_neoformans_var_grubii_h99_gca_000149245.CNA3.55.gtf --
outReadsUnmapped Fastx --genomeDir Cneoformans-grubii_H99_genome_MAR-
2023/Cneoformans_H99_INDEX/ --readFilesIn Transcriptoma_Gustavo-
Barbara/00_fastq/BAL6h1_R1_001.fastq Transcriptoma_Gustavo-
Barbara/00_fastq/BAL6h1_R2_001.fastq --outFileNamePrefix BAL6h1 >
log_STARmapping_bal6h1.txt
```

- Mapeamento do BAL 6h2 (2ª replicata da condição de infecção às 6 horas):

```
STAR --outSAMattributes All --outSAMtype BAM SortedByCoordinate --quantMode
GeneCounts --sjdbGTFfile Cneoformans-grubii_H99_genome_MAR-
2023/Cryptococcus_neoformans_var_grubii_h99_gca_000149245.CNA3.55.gtf --
outReadsUnmapped Fastx --genomeDir Cneoformans-grubii_H99_genome_MAR-
2023/Cneoformans_H99_INDEX/ --readFilesIn Transcriptoma_Gustavo-
Barbara/00_fastq/BAL6h2_R1_001.fastq Transcriptoma_Gustavo-
Barbara/00_fastq/BAL6h2_R2_001.fastq --outFileNamePrefix BAL6h2 >
log_STARmapping_bal6h2.txt
```

- Mapeamento do BAL 10d1 (1ª replicata da condição de infecção aos 10 dias):

```
STAR --outSAMattributes All --outSAMtype BAM SortedByCoordinate --quantMode
GeneCounts --sjdbGTFfile Cneoformans-grubii_H99_genome_MAR-
2023/Cryptococcus_neoformans_var_grubii_h99_gca_000149245.CNA3.55.gtf --
outReadsUnmapped Fastx --genomeDir Cneoformans-grubii_H99_genome_MAR-
2023/Cneoformans_H99_INDEX/ --readFilesIn Transcriptoma_Gustavo-
Barbara/00_fastq/BAL10d1_R1_001.fastq Transcriptoma_Gustavo-
Barbara/00_fastq/BAL10d1_R2_001.fastq --outFileNamePrefix BAL10d1 >
log_STARmapping_bal10d1.txt
```

- Mapeamento do BAL 10d2 (2ª replicata da condição de infecção aos 10 dias):

```
STAR --outSAMattributes All --outSAMtype BAM SortedByCoordinate --quantMode
GeneCounts --sjdbGTFfile Cneoformans-grubii_H99_genome_MAR-
2023/Cryptococcus_neoformans_var_grubii_h99_gca_000149245.CNA3.55.gtf --
outReadsUnmapped Fastx --genomeDir Cneoformans-grubii_H99_genome_MAR-
2023/Cneoformans_H99_INDEX/ --readFilesIn Transcriptoma_Gustavo-
Barbara/00_fastq/BAL10d2_R1_001.fastq Transcriptoma_Gustavo-
```

```
Barbara/00_fastq/BAL10d2_R2_001.fastq --outFileNamePrefix BAL10d2 >  
log_STARmapping_bal10d2.txt
```

O resultado desta etapa foram 2 arquivos (.BAM) para cada condição estudada (6 horas, 10 dias e YPD), referentes às suas replicatas.

4.5. Análises de Processamento diferencial de genes

Para estimar e identificar os genes de *C. neoformans* que sofreram algum tipo de processamento diferencial nos seus transcritos no contexto da infecção – dentre aqueles genes que se mostraram expressos nos tempos estudados –, foram utilizadas distintas metodologias, descritas a seguir.

4.5.1. Análise de uso diferencial dos éxons (DEU)

O primeiro tipo de análise realizada se deu logo após o mapeamento dos *reads* nos dois genomas de referência (etapa anterior), e a partir dos arquivos BAM, foi utilizado o software DEXseq (ANDERS *et al.*, 2012) para de discriminar, em *C. neoformans*, os genes que apresentaram uso diferencial de pelo menos um éxon quando as seguintes condições foram comparadas: BAL 6 horas versus YPD (6h vs. YPD), BAL 10 dias versus YPD (10d vs. YPD) e BAL 6 horas versus BAL 10 dias (6h vs. 10d).

Este programa, que roda na linguagem R, usa a contagem individual dos *reads* mapeados aos éxons de cada gene para calcular o uso diferencial destes éxons entre as duas condições analisadas e, assim, diferenciar aqueles genes que sofreram mudança no uso relativo dos éxons. Assim sendo, para cada arquivo BAM gerado na etapa de mapeamento, foi calculado o número de *reads* que se sobrepõem a cada éxon e, então, este valor foi comparado com o valor correspondente em outra condição. Um éxon foi considerado com uso diferencial quando seu valor p era igual a 0 e seu valor de padj, quando presente, era menor que 0,05.

4.5.2. Análise de *Splicing* alternativo Diferencial (DAS) e a identificação dos tipos de *Splicing* alternativo (AS)

Como o DEXseq calcula apenas o uso diferencial de éxons (DEU), somente esta ferramenta não é suficiente para inferir os genes que sofrem *splicing* alternativo, uma vez que a ferramenta também poder representar genes que sofreram DEU por mudanças nos sítios de poliadenilação e nos sítios de início da transcrição. Portanto, se fez necessário a busca e o uso de outra ferramenta que possibilitasse a identificação de genes que efetivamente sofrem *splicing* alternativo, bem como a definição dos padrões de AS sofridos por tais.

Também a partir dos dados de cada condição estudada – já mapeados com o genoma de referência – (BAM), foi utilizado o programa *Replicate Multivariate Analysis of Transcript Splicing* (rMATS) v. 4.1.1 (SHEN et al., 2014), no Python versão 3.8.10, para verificar as diferenças nos tipos de *splicing* alternativo que ocorreram em *C. neoformans* entre as mesmas três comparações descritas acima: 6h vs. YPD, 6h vs. 10d e 10d vs. YPD.

rMATS detecta *splicing* alternativo diferencial (DAS) entre diferentes condições, a partir de replicatas pareadas ou não pareadas. As análises deste trabalho foram realizadas com réplicas pareadas, que foram tratadas pelo programa a partir de uma distribuição normal bivariada para modelar a correlação entre as amostras analisadas. Além disso, o programa também utiliza um teste de razão de verossimilhança para calcular o *splicing* diferencial e uma estrutura hierárquica para calcular os níveis de inclusão dos éxons, considerando, simultaneamente, a estimativa das replicatas individuais e a variabilidade entre as replicatas – o que permite identificação de cinco tipos principais de padrões de AS nas amostras analisadas: Uso alternativo de éxons (ES), Retenção de íntrons (RI), Éxons mutuamente excludentes (MXE), Sítio alternativo de splicing 3' (A3'SS) e Sítio alternativo de splicing 5' (A5'SS). Os comandos utilizados nesta etapa se encontram descritos a seguir.

- Busca por tipos de *splicing* em *C. neoformans* comparando o BAL 6h e YPD:

```
python /python_env/rmats-turbo/rmats.py --b1 /data/Transcriptoma_Gustavo-  
Barbara/rmats_results/b1_YPD1C_docker.txt --b2 /data/Transcriptoma_Gustavo-  
Barbara/rmats_results/b2_BAL6H1_docker.txt --gtf /data/Transcriptoma_Gustavo-  
Barbara/rmats_results/Cryptococcus_neoformans_var_grubii_h99_gca_000149245  
.CNA3.55.gtf -t paired --readLength 150 --od /data/Transcriptoma_Gustavo-
```

```
Barbara/rmats_results/ypdXbal6h --tmp /data/Transcriptoma_Gustavo-
Barbara/rmats_results/tmp_ypdXbal6h
```

- Busca por tipos de *splicing* em *C. neoformans* comparando BAL 10d e YPD:

```
python /python_env/rmats-turbo/rmats.py --b1 /data/Transcriptoma_Gustavo-
Barbara/rmats_results/b1_YPD1C_docker.txt --b2 /data/Transcriptoma_Gustavo-
Barbara/rmats_results/b3_BAL10d1_docker.txt --gtf /data/Transcriptoma_Gustavo-
Barbara/rmats_results/Cryptococcus_neoformans_var_grubii_h99_gca_000149245
.CNA3.55.gtf -t paired --readLength 150 --od /data/Transcriptoma_Gustavo-
Barbara/rmats_results/ypdXbal10d --tmp /data/Transcriptoma_Gustavo-
Barbara/rmats_results/tmp_ypdXbal10d
```

- Busca por tipos de *splicing* em *C. neoformans* comparando BAL 6h e BAL 10d:

```
python /python_env/rmats-turbo/rmats.py --b1 /data/Transcriptoma_Gustavo-
Barbara/rmats_results/b2_BAL6H1_docker.txt --b2 /data/Transcriptoma_Gustavo-
Barbara/rmats_results/b3_BAL10d1_docker.txt --gtf /data/Transcriptoma_Gustavo-
Barbara/rmats_results/Cryptococcus_neoformans_var_grubii_h99_gca_000149245
.CNA3.55.gtf -t paired --readLength 150 --od /data/Transcriptoma_Gustavo-
Barbara/rmats_results/bal6hXbal10d --tmp /data/Transcriptoma_Gustavo-
Barbara/rmats_results/tmp_bal6hXbal10d
```

4.5.3. Anotação e categorização funcional dos genes que sofreram DAS

Após tais análises, foi realizada de forma manual a identificação de todos os genes resultantes das análises realizadas no DEXseq no rMATS, bem como das funções de seus transcritos. Para tal, foram utilizadas as plataformas FungiDB (<https://fungidb.org/fungidb/app>) e Ensembl Fungi (<https://fungi.ensembl.org/index.html>), pois, a partir delas, é possível obter diversas informações relevantes, como o tipo de gene, tipo de transcrito codificado por tal gene,

número de transcritos anotados, a descrição funcional do transcrito e número de éxons, dentre outras.

Além disso, foram realizadas análises de enriquecimento funcional com base nos termos definidos no Gene Ontology (GO) (<http://geneontology.org/>) (*The Gene Ontology Consortium*, 2015) e fundamentadas nas bases de dados KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) (<https://www.genome.jp/kegg/>), a fim de constatar se genes envolvidos em vias importantes para a sobrevivência de *C. neoformans* no contexto da infecção, constam como tendo uso diferencial de éxons (DEU) e como sofrendo splicing alternativo diferencial (DAS).

4.6. Visualização das sequências

Ao longo das análises de categorização e enriquecimento funcional dos genes que apresentam DEU e DAS, genes interessantes foram explorados visualmente através do software IGV (*Integrative Genomics Viewer*) (<https://software.broadinstitute.org/software/igv/>), versão 2.14.1 (ROBINSON *et al.*, 2011).

Para tal exploração dos dados, foram utilizados os arquivos BAM de cada condição estudada, após ser inserido no aplicativo o genoma de referência de *C. neoformans* var. *grubii* H99 “Cryptococcus_neoformans_var_grubii_h99_gca_000149245.CNA3.dna.toplevel.fa.gz”, e o arquivo de anotação GFF (*General Feature Format*) “Cryptococcus_neoformans_var_grubii_h99_gca_000149245.CNA3.56.gff3.gz” – ambos disponíveis no site ENSEMBL (https://fungi.ensembl.org/Cryptococcus_neoformans_var_grubii_h99_gca_000149245/Info/Index).

Após a etapa de carregamento do genoma de referência cada espécie, foram utilizados os arquivos BAM obtidos em cada tempo estudado, pois estes representam os dados genéticos obtidos nos tempos estudados já mapeados com os genomas de referência. Dessa forma, foi possível visualizar e comparar os alinhamentos das sequências obtidas no contexto da infecção e, também, investigar os padrões das junções entre éxons presentes nos dados – principalmente, através dos sashimi plots – o que permite a identificação de certos tipos de padrões de splicing alternativo.

5. RESULTADOS

5.1. Sequenciamento das amostras estudadas

Inicialmente, foi analisada a qualidade do sequenciamento realizado após a etapa de experimentação animal. Na tabela 1 estão dispostas as informações relativas ao sequenciamento de cada amostra estudada.

Tabela 1: Dados oriundos de sequenciamento genômico das amostras analisadas.

Amostra	Número de <i>reads</i> presentes	Número de bases sequenciadas por rodada de sequenciamento	Score de qualidade (Phred)
BAL6h1	34,773,919	10,432	35.46
BAL6h2	45,536,641	13,661	35.50
BAL10d1	35,858,545	10,758	34.92
BAL10d2	36,346,653	10,904	34.91
YPD1	26,632,962	7,99	35.57
YPD2	25,955,261	7,787	35.55

Observa-se que o número de reads presentes nas amostras BAL6h1, BAL6h2, BAL10d1 e BAL10d2 são maiores que os presentes nas amostras YPD1 e YPD2. Tal fato condiz com o esperado, uma vez que as quatro primeiras amostras possuem reads referentes a *C. neoformans* e a *M. musculus* (hospedeiro) – por serem provenientes do BAL murino durante a infecção e o trabalho se basear em um RNAseq duplo durante a infecção –, enquanto as duas últimas amostras só possuem reads referentes ao patógeno (vide metodologia, item 4.3). Além disso, é possível notar que todos os valores de score de qualidade estão acima de 30, ou seja, apenas 1 a cada 1000 bases pode estar sequenciada de forma errônea. Tal resultado indica que o sequenciamento de cada base tem a fidedignidade de cerca de 99,9% - um resultado que se mostra como uma base confiável para as análises seguintes.

5.2. Alinhamento ao genoma de referência

Após o sequenciamento, foi realizado o alinhamento dos reads com o genoma de referência de *C. neoformans* H99. Na tabela 2 estão dispostas as informações relativas ao mapeamento de cada amostra estudada.

Tabela 2: Dados oriundos do alinhamento das sequências geradas em cada condição ao genoma de referência (*C. neoformans* H99).

Amostra	Número de reads presentes	Quantidade de reads mapeados	Porcentagem de reads mapeados
BAL6h1	34,773,919	283,36	0.84
BAL6h2	45,536,641	650,886	1.47
BAL10d1	35,858,545	415,287	1.19
BAL10d2	36,346,653	579,106	1.64
YPD1	26,632,962	25,820,614	99.21
YPD2	25,955,261	25,185,198	99.23

Analisando tais dados, nota-se que as maiores porcentagens de reads mapeados são relativas às amostras YPD1 e YPD2, chegando quase a 100% de mapeamento. Em contraste, tem-se baixas porcentagens nas amostras resultantes da infecção (6h e 10d). Contudo, esta diferença não indica erro metodológico ou má qualidade das amostras, uma vez que é explicada pelo fato das amostras de 6h e 10d serem provenientes de RNA-seq duplo (LI et al., 2019; SEELBINDER et al., 2020). Este tipo de metodologia tem como base um pool de reads provenientes de duas espécies distintas – com taxas distintas de genes e transcritos – e, dessa forma, o que se observa é uma maior cobertura dos reads resultantes daquela espécie de maior genoma: *Mus musculus*, no caso deste trabalho.

5.3. Análise de processamento diferencial dos genes.

Para estimar e identificar os genes de *C. neoformans* que sofreram algum tipo de processamento diferencial nos seus transcritos no contexto da infecção, foram utilizadas as ferramentas: (a) DEXseq (ANDERS et al., 2012), para calcular o Uso Diferencial de Éxons (DEU) dos genes nas comparações 6h vs. YPD, 10d vs. YPD e 6h vs. 10d; e (b) rMATS, para calcular o *Splicing* Alternativo Diferencial (DAS), nas

mesmas três comparações. O uso das duas ferramentas é justificado por tais identificarem os eventos de processamento alternativo de forma distinta: a partir do DEU foi possível discriminar os genes de *C. neoformans* que apresentaram uso diferencial de pelo menos um éxon quando as comparações foram realizadas, entretanto, tal ferramenta não é capaz de definir com exatidão quais os genes que sofrem *splicing* alternativo (AS – *Alternative Splicing*) – como explicitado no item 4.5.2. Já a ferramenta rMATS cumpre tal papel, ao ser utilizada para definir quais genes efetivamente sofrem *splicing* alternativo diferencial (DAS – *Differential Alternative Splicing*) em *C. neoformans* entre as condições estudadas (6h vs. YPD, 10d vs. YPD e 6h vs. 10d). Ademais, tal ferramenta também permite a determinação de quais eventos (padrões) de AS ocorrem: Retenção de íntrons (IR – *Intron Retention*), Uso alternativo de éxon (ES – *Exon Skipping*), Éxons mutuamente excludentes (MXE – *Mutually Exclusive Exons*), Sítio alternativo de *splicing* 5' (A5'SS – *Alternative 5' Splicing Site*) e Sítio alternativo de *splicing* 3' (A3'SS – *Alternative 3' Splicing Site*) – conforme descrito no item 1.4.

5.3.1. Caracterização global dos eventos de DEU e DAS

Primeiramente, foi realizada uma análise global dos resultados obtidos pelas duas metodologias, descrita a seguir.

5.3.1.1. Número de eventos e genes que apresentam DEU ou DAS

Considerando as três comparações, foi possível identificar 221 genes com DEU, sendo 109 na comparação 6h vs. YPD, 93 na comparação 10d vs. YPD e 19 às 6h vs. 10d. Dentre estes genes, observa-se que há 26 em comum entre as comparações 6h vs. YPD e 10d vs. YPD, 5 entre 6h vs. YPD e 6h vs. 10d e 16 entre 10d vs. YPD e 6h vs. 10d (Figura 4). Já na interseção entre as três comparações há 4 genes: CNAG_00930 (*Argininosuccinate synthase*), CNAG_02458 (*GTPase activating protein*), CNAG_6717 (*Acyl-CoA-dependent ceramide synthase*) e CNAG_6725 (*DNA polymerase delta subunit 2*), sendo que CNAG_00930 e CNAG_06725 participam de processos biológicos importantes, como produção de arginina e replicação do DNA, respectivamente. As listas com todos os genes resultantes desta análise se encontram no ANEXO 1 (Tabelas S1, S2 e S3).

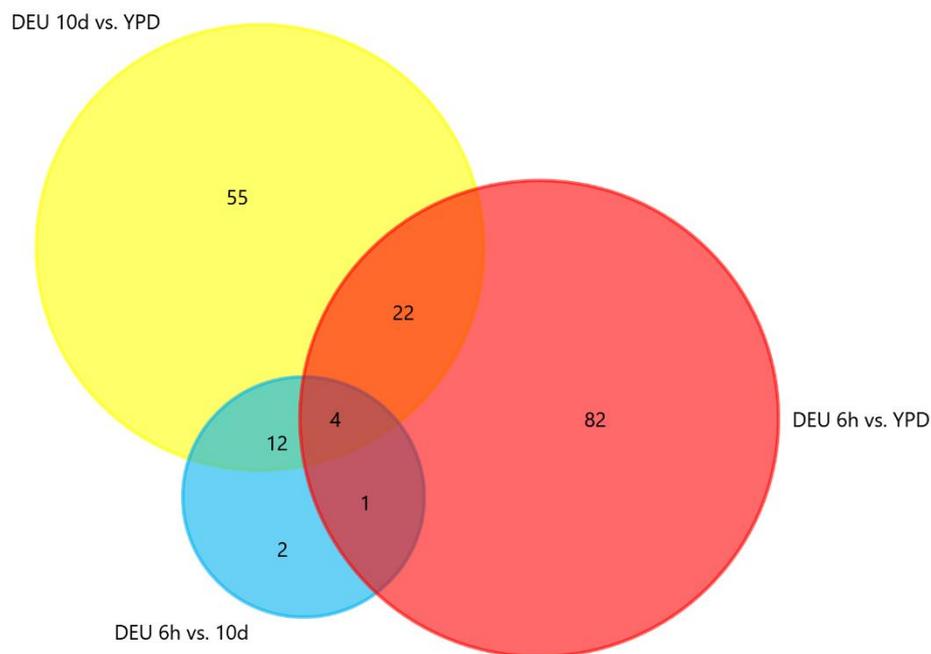


Figura 4: Diagrama de Venn mostrando a distribuição dos 221 genes de *C. neoformans* que apresentaram uso diferencial de éxons nas três comparações estudadas (6h vs. YPD e 10d vs. YPD e 6h vs. 10d).

Quando se considera a análise de *splicing* alternativo diferencial (DAS), foi possível identificar, inicialmente, 1281 eventos de DAS em *C. neoformans* nas três comparações 6h vs. YPD, 10d vs. YPD e 6h vs. 10d. Sendo 523 eventos na primeira comparação, 518 na segunda e 240 na terceira. A Tabela 3 apresenta a quantidade de eventos de AS, enquanto a Tabela 4 demonstra o número de genes em que cada evento ocorre.

Tabela 3: Quantidade de eventos e tipos de DAS em genes de *C. neoformans* em cada comparação realizada.

Tipo de DAS	6h vs. YPD	10d vs. YPD	6h vs. 10d	TOTAL
A3'SS	118	118	118	354
A5'SS	10	10	10	30
MXE	1	1	0	2
IR	86	86	85	257
ES	308	303	27	638
TOTAL	523	518	240	1281

Tabela 4: Quantidade total de genes de *C. neoformans* que apresentaram DAS em cada comparação realizada.

Tipo de DAS	6h vs. YPD	10d vs. YPD	6h vs. 10d	TOTAL
A3'SS	109	109	109	327
A5'SS	10	10	10	30
MXE	1	1	0	2
IR	79	79	78	236
ES	285	281	25	591
TOTAL	484	480	222	1186

Analisando os genes envolvidos nestes 1281 eventos de DAS, observou-se que o número de genes apresentando DAS (1186 genes) foi menor que o número de eventos A3'SS, A5'SS, MXE, IR e ES (1281 eventos) (Tabelas 3 e 4). Investigando esta questão, descobriu-se que alguns genes apresentavam mais de um mesmo tipo de AS. Dessa forma, nas três comparações, tem-se 118 eventos de A'3SS em 109 genes – o que significa que existem 9 transcritos variantes presentes, referentes à genes que já constavam nas análises. Quanto aos eventos de IR, nas comparações 6h vs. YPD e 10d vs. YPD, observa-se 86 eventos ocorrendo em 79 genes, enquanto na comparação de 6h vs. 10d, têm-se 85 eventos em 78 genes – o que implica em 7 transcritos variantes presentes e sofrendo IR em todas as comparações estudadas. Já no evento de ES, a quantidade de genes em que ocorre este evento é muito diferente entre as comparações: (a) na comparação 6h vs. YPD, existem 308 eventos ocorridos em 285 genes – ou seja, 23 transcritos variantes; (b) em 10d vs. YPD o que se observa são 303 eventos ocorridos em 281 genes – 22 transcritos variantes; e (c) em 6h vs. 10d, constam 27 eventos de ES ocorrendo em 25 genes – implicando em 2 transcritos variantes presentes por meio de ES.

No total, identificamos 484 genes presentes na comparação 6h vs. YPD, 480 aos 10d vs. YPD e 222 na comparação 6h vs. 10d (Tabela 4). As listas com todos os genes resultantes dessa análise se encontram no ANEXO 2 (Tabelas S4, S5 e S6), com os genes que apresentaram variantes devidamente sinalizados com “*”.

A partir desta descoberta, foram investigados aqueles genes que se apresentaram mais de uma vez como manifestando um mesmo evento de AS, ou seja, aqueles que apresentavam variantes nas nossas análises, e o que se observou é que todos os genes que apresentaram A3'SS e IR já possuíam dois ou mais transcritos anotados nos bancos de dados. Contudo, é importante ressaltar que nem todos os genes que possuem mais de um transcrito anotado e que apresentam DAS em nossas análises estão duplicados ou triplicados dentro das condições.

Quando se observaram os genes que apresentavam ES nas condições 6h vs. YPD e 10d vs. YPD, foi possível notar que 15 deles possuíam apenas um transcrito anotado (CNAG_00036, CNAG_00057, CNAG_02079, CNAG_02751, CNAG_02789, CNAG_03844, CNAG_04659, CNAG_04821, CNAG_05146, CNAG_05424, CNAG_05555, CNAG_05994, CNAG_07541, CNAG_07547 e CNAG_08008) – o que implica que estes genes apresentam, em nossas análises, eventos de DAS ainda não anotados. Com base nestes resultados, esses genes foram explorados visualmente através do programa IGV (*Integrative Genome Viewer*), com a finalidade de investigar as alterações nas estruturas dos transcritos presentes nos momentos de infecção analisados, comparado ao cultivo em YPD. Desta forma, foi possível criar gráficos do tipo *Sashimi plots*, que permitem identificar visualmente os padrões de AS apresentados pelos genes. Abaixo estão ilustradas as figuras referentes ao gene CNAG_02751, que codifica uma desidrogenase e que apresentou uso alternativo do éxon (ES) do éxon 3 na condição controle YPD, quando se comparara a condição de infecção às 6 horas e aos 10 dias (Figura 5). Contudo, ao analisar o éxon 6 na condição controle, ele também parece apresentar um uso alternativo de éxon (ES), tanto em comparação com a condição de infecção às 6h, quanto em comparação com a infecção aos 10 dias (Figura 6). Esta presença de dois eventos do mesmo tipo em um mesmo gene poderia explicar a quantidade repetida de vezes que cada gene duplicado (ou triplicado) apresentou.

Além disso, este gene possui apenas um transcrito anotado, como pode-se perceber pelas imagens, onde a anotação (região em azul na parte inferior) conta apenas com um transcrito presente. Isso significa que não existe anotação nos bancos de dados de que a não inclusão do éxon 3 e do 6 podem ocorrer em certas condições experimentais – o que se mostra como uma novidade apresentada neste trabalho.

Entretanto, se percebem nas imagens uma grande expressão dos éxons 3 e 6 na condição YPD (representada pelas barras coloridas acima de cada éxon), além de um grande número de junções (arcos conectando os éxons – representam a quantidade de reads do RNA-seq que se mapeou nos limites entre os éxons) presentes conectando os éxons que sofrem ES com seus éxons anterior e posterior. Isso pode significar que, na condição YPD, têm-se mais de um tipo de transcrito sendo expresso: um que contém todos os éxons, como ocorre convencionalmente, e um (ou mais) em que os eventos de ES ocorrem – neste caso, não se sabe se os dois eventos acontecem simultaneamente no mesmo transcrito ou se há a produção de diferentes transcritos, ora com ES no éxon 3 e ora no éxon 6.

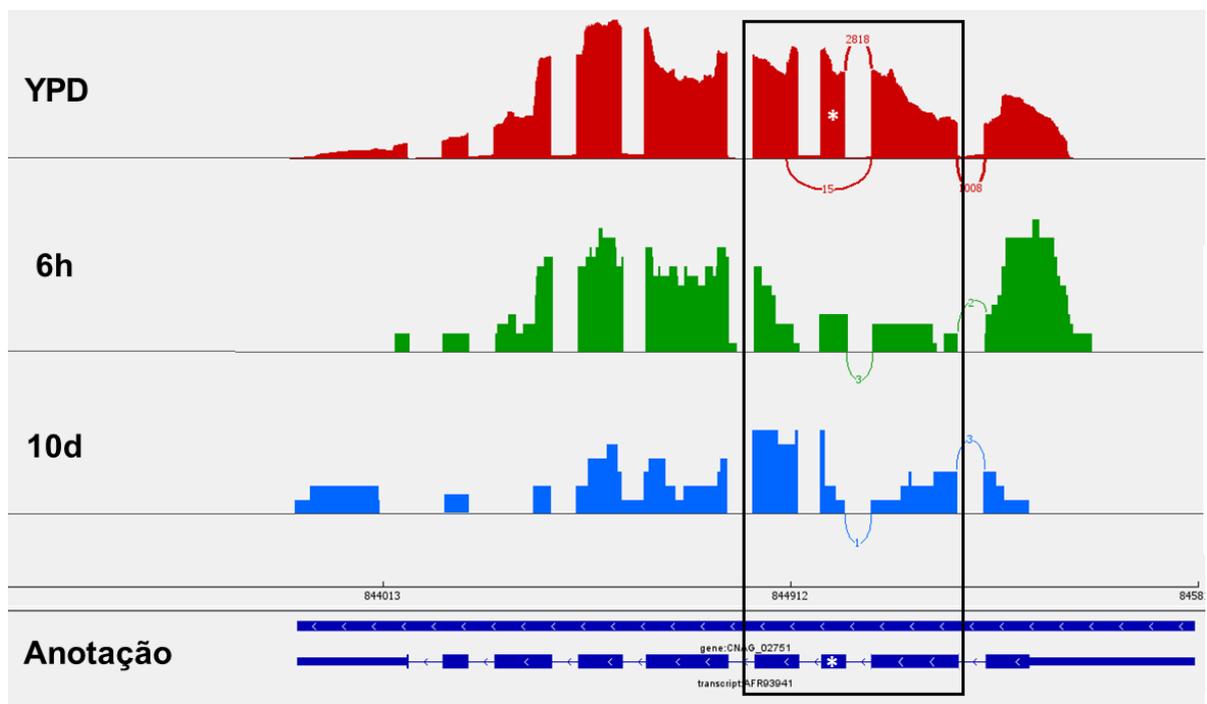


Figura 5: *Sashimi plot* do gene CNAG_02751 (*Short-chain dehydrogenase*) nas condições YPD (em vermelho), BAL6h (em verde) e BAL10d (em azul claro). A região marcada revela a região onde houve o uso alternativo de éxon (ES) no 3º éxon do gene, na condição YPD. Os retângulos azuis localizados na parte inferior da imagem representam os éxons presentes na anotação do genoma de H99. As linhas em forma de arcos correspondem às junções entre o fim de um éxon e o início do outro e o número que as acompanha representa o número de *reads* existentes em tais junções. Na imagem, somente as junções relacionadas ao evento estão representadas. Quando estas estão presentes conectando éxons que não são subsequentes, é indicativo de que há a exclusão do(s) éxon(s) presentes entre aqueles conectados pelas junções. * Éxon excluído.

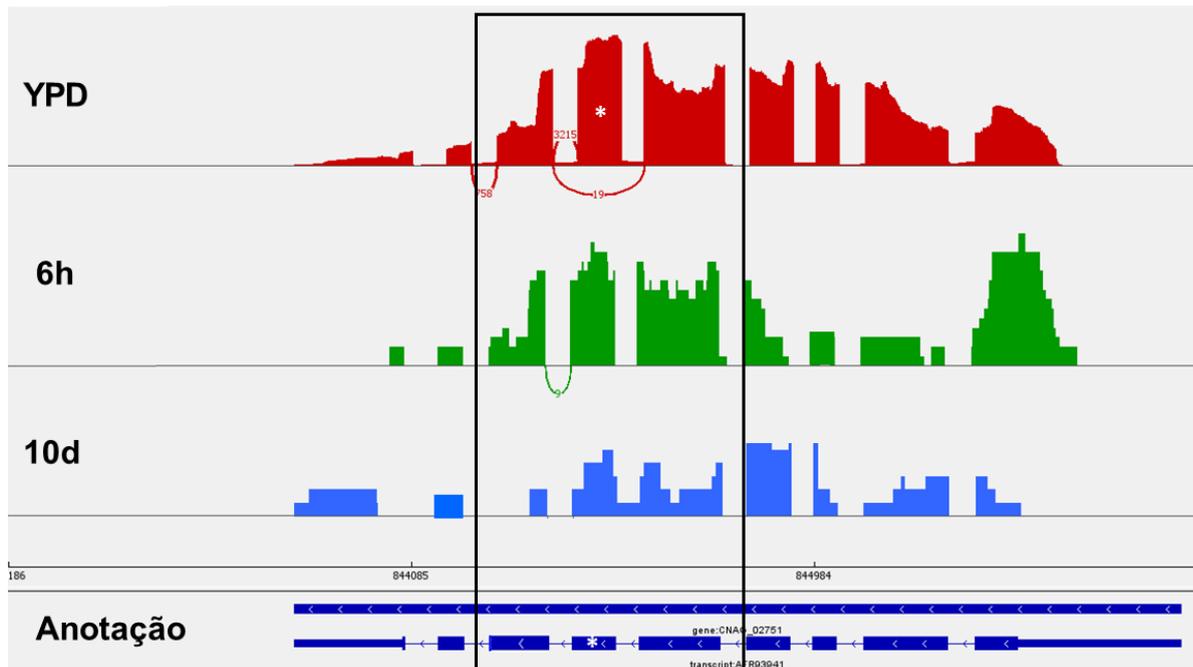


Figura 6: *Sashimi plot* do gene CNAG_02751 (*Short-chain dehydrogenase*) nas condições YPD (em vermelho), BAL6h (em verde) e BAL10d (em azul claro). A região marcada revela a região onde houve o uso alternativo de éxon (ES) no 6º éxon do gene, na condição YPD. Os retângulos azuis localizados na parte inferior da imagem representam os éxons presentes na anotação do genoma de H99. As linhas em forma de arcos correspondem às junções entre o fim de um éxon e o início do outro e o número que as acompanha representa o número de *reads* existentes em tais junções. Na imagem, somente as junções relacionadas ao evento estão representadas. Quando estas estão presentes conectando éxons que não são subsequentes, é indicativo de que há a exclusão do(s) éxon(s) presentes entre aqueles conectados pelas junções. * Éxon excluído.

Ao realizar análises para verificar se há genes se repetindo entre os 5 padrões de DAS detectados, foi descoberto que certos genes apareciam mais de uma vez dentro da mesma comparação, apresentando tipos diferentes de AS. Dessa forma, foi realizada uma análise para excluir essas repetições e o que se obteve foram 459 genes distintos (sem repetições entre os padrões de AS) na comparação 6h vs. YPD, 210 às 6h vs. 10d e 455 aos 10d vs. YPD, como demonstrado na tabela 5. De forma prática, isso significa que alguns genes apresentam mais de um tipo de AS ao mesmo tempo, na mesma comparação: 25 na 6h vs. YPD e na 10d vs. YPD e 12 na comparação de 6h vs. 10d.

Tabela 5: Quantidade de genes de *C. neoformans* que apresentaram algum tipo de DAS em cada comparação estudada^(*).

	6h vs. YPD	10d vs. YPD	6h vs. 10d	TOTAL
TOTAL	459	455	210	1124

(*) Desconsiderando aqueles genes que apareceram mais de uma vez dentro da mesma comparação, por constarem como sofrendo mais de um tipo de AS.

Da mesma maneira, também foi investigado o número de genes que apresentaram DAS entre as três comparações estudadas. Observou-se que, na realidade, a maioria dos genes aparece nas comparações realizadas. Dos 461 genes, 203 são comuns às três comparações, enquanto 453 genes são comuns entre as comparações 6h vs. YPD e 10d vs. YPD, 209 genes comuns nas comparações 6h vs. YPD e 6h vs. 10d, e 204 genes entre 10d vs. YPD e 6h vs. 10d (Figura 7).

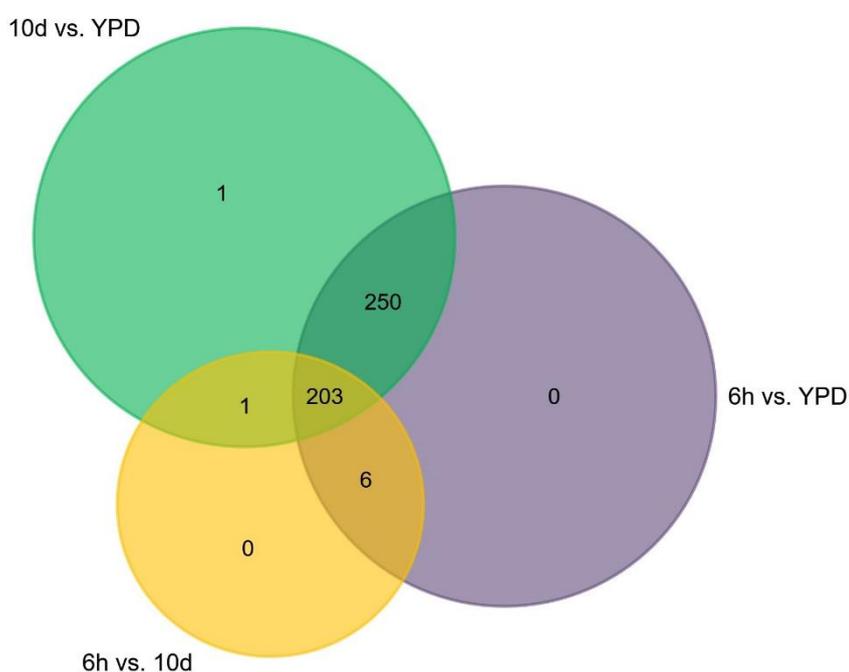


Figura 7: Diagrama de Venn mostrando o número de genes de *C. neoformans* que apresentaram *splicing* alternativo diferencial nas três comparações estudadas (6h vs. YPD, 6h vs. 10d e 10d vs. YPD). Este diagrama considera cada gene apenas uma vez (sem duplicidade dentro de cada comparação, bem como entre elas).

Analisando novamente cada comparação separadamente, foi possível discriminar quantos genes apresentaram cada tipo de *splicing* alternativo: ES, IR, A3'SS, A5'SS e MXE (Figura 8). Ao avaliar tais informações, observou-se que nas comparações entre o controle (YPD) e as condições de infecção (6h vs. YPD e 10d vs. YPD), há um grande número de genes com eventos de ES (uso alternativo de éxon) ($n > 260$), seguido pelo A3'SS ($n > 100$), enquanto na comparação entre dois momentos da infecção (6h vs. 10d), a maioria dos eventos de AS foram do tipo A3'SS (sítio de *splicing* alternativo 3') (Figura 8). Em todas as comparações, observa-se, entretanto, que o tipo de AS de menor frequência é o MXE (éxons mutuamente excludentes), que somente se faz presente uma vez na comparação 6h vs. YPD e na 10d vs. YPD, sendo o mesmo gene e constando este como apresentando, também, outro tipo de DAS nas duas ocasiões.

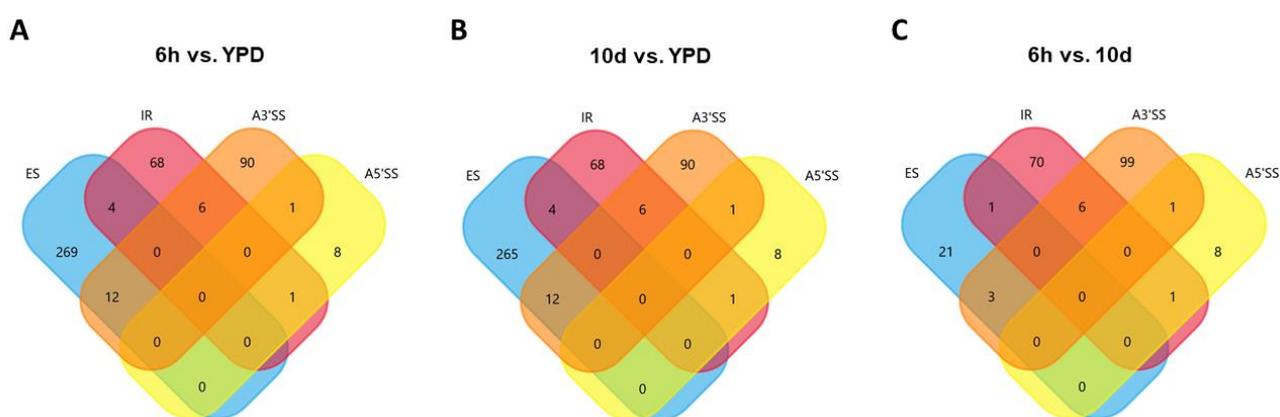


Figura 8: Diagrama de Venn mostrando o número de genes de *C. neoformans* que apresentaram cada tipo de *splicing* alternativo diferencial nas comparações: (A) 6h vs. YPD, (B) 10d vs. YPD e (C) 6h vs. 10d. A3'SS: Sítio alternativo de *splicing* 3'; A5'SS: Sítio alternativo de *splicing* 5'; ES: Uso alternativo de éxon; IR: Retenção de íntron. * O gene único que se comportou como sofrendo MXE às 6h vs. YPD e aos 10d vs. YPD não está representado neste gráfico.

Além da identificação de quantos e quais genes passam por qual evento de *splicing* alternativo, era interessante que esses eventos pudessem ser explorados visualmente nos momentos de infecção analisados e expostos de forma gráfica. Por essa razão, o programa IGV foi utilizado e, em meio às análises, foi possível distinguir mais de um gene que apresenta dois tipos distintos de eventos de DAS ao mesmo tempo. A figura 9 mostra a análise realizada para o gene CNAG_05734, que codifica uma proteína

relacionada aos processos de biogênese e organização da parede celular e que apresenta DAS entre as condições de infecção e o controle, especificamente os tipos ES e IR. Na figura 9A se pode notar o processo de *splicing* alternativo diferencial do tipo IR ocorrendo no controle, quando comparado com o momento de 6h de infecção. Contudo, existem dois transcritos anotados para este gene: o primeiro tendo 6 éxons e o segundo tendo 8. Este fato – somado à quantidade de reads que se alinharam aos éxons no YPD e, também, ao padrão das junções destes éxons – indicam que, na verdade, este processo de IR foi identificado nesta condição, pois ela apresenta os dois transcritos anotados para o gene, sendo que a expressão do primeiro deles (6 éxons) está provocando esta diferença entre as condições, já que na condição de 6h há somente a expressão do segundo transcrito. Na figura 9B já é possível notar um evento ES do último éxon – que está presente na condição YPD, mas não às 6h de infecção.

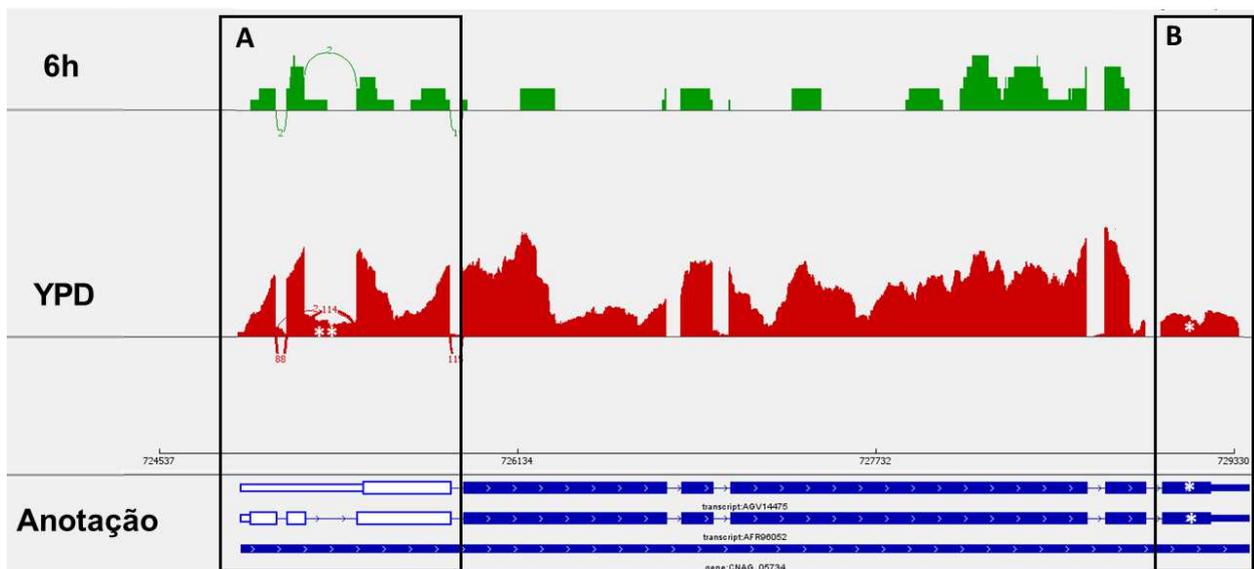


Figura 9: *Sashimi plot* do gene CNAG_05734 (*SLA2 - cell wall organization and biogenesis-related protein*) nas condições BAL6h e YPD. (A) Destaca a região onde houve a retenção de íntrons (IR), na condição YPD em relação a 6h. (B) Destaca o uso alternativo de éxon (ES), na condição 6h em relação ao YPD. Os retângulos azuis localizados na parte inferior da imagem representam os éxons presentes na anotação. * Éxon excluído; ** Íntron retido.

5.3.1.2. Localização genômica, número de íntrons e anotação dos genes que apresentam DEU ou DAS

A partir dos códigos dos genes (prefixo CNAG) que apresentaram DEU (n=221) e DAS (n=1886, considerando, inclusive, os genes que se repetem dentro de uma

mesma comparação, por apresentarem mais de um evento de AS ao mesmo tempo), foi realizada uma análise de caracterização global. Utilizando os bancos de dados FungiDB e Ensembl Fungi, foi possível caracterizar os genes identificados neste trabalho com base em: (a) sua localização no genoma; (b) número de transcritos codificados por esses genes; e (c) número de íntrons presentes nos genes.

A Figura 10 apresenta o perfil de distribuição dos genes com DEU ao longo dos 14 cromossomos presentes no genoma de *C. neoformans*, além da mitocôndria (MT). É possível perceber que, apesar de haver uma maior concentração nos cromossomos 1, 5 e 6, nas três comparações estudadas, tem-se genes com uso diferencial de éxons por todo o genoma. Este padrão já não se repete quando se analisa as localizações dos genes com DAS (Figura 11), uma vez que não foi constatado nenhum gene apresentando DAS localizado no genoma mitocondrial.

Distribuição dos genes de *C. neoformans* que apresentaram DEU nas comparações estudadas

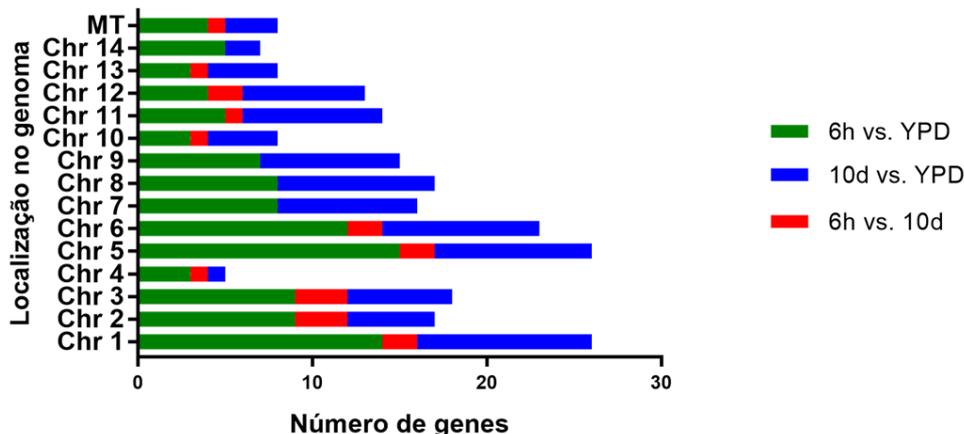


Figura 10: Localização genômica dos genes de *C. neoformans* que apresentaram uso diferencial de éxons nas três comparações estudadas (6h vs. YPD, 6h vs. 10d e 10d vs. YPD). Observa-se uma distribuição coesa dos genes ao longo do genoma.

Distribuição dos genes de *C. neoformans* que apresentaram DAS nas comparações estudadas

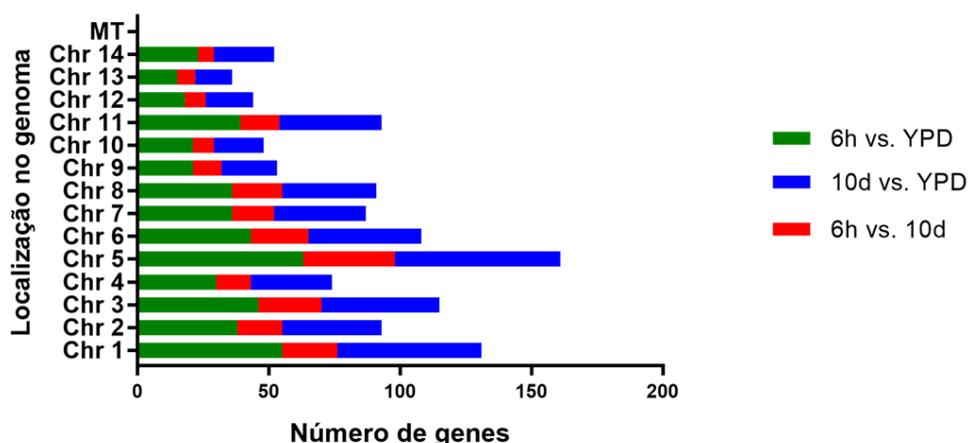


Figura 11: Localização genômica dos genes de *C. neoformans* que apresentaram DAS nas três comparações estudadas (6h vs. YPD, 6h vs. 10d e 10d vs. YPD). Observa-se uma distribuição coesa dos genes ao longo do genoma, com exceção da mitocôndria.

Outra análise de caracterização realizada foi relacionada ao número de transcritos de cada gene que apresentou DEU e DAS. Esta investigação é relevante, uma vez que mais de um transcrito codificado implica em *splicing* alternativo e, dessa maneira, seria possível identificar aqueles genes que já possuem em sua anotação, eventos de AS. Como exposto na Figura 12, notou-se, interessantemente, que a maioria dos genes com DEU possuem apenas um transcrito anotado ($n=185$) e que a quantidade de genes diminui à medida que o número de transcritos anotados cresce (Figura 12 A-C).

Nas análises relativas ao número de transcritos codificados por cada gene que apresentou DAS (Figura 12 D-F) é possível notar que, apesar de o número de genes com somente um transcrito também ser alta nas duas comparações entre o controle e os momentos de infecção (6h vs. YPD e 10d vs. YPD) (Figura 12 D e E), a maioria dos genes que apresentaram DAS já possuem em sua anotação mais de um transcrito ($n=703$) – o que significa que já é conhecido pelo menos um evento de *splicing* alternativo desses genes. Contudo, ainda se observa um grande número de genes com apenas um transcrito anotado ($n=483$).

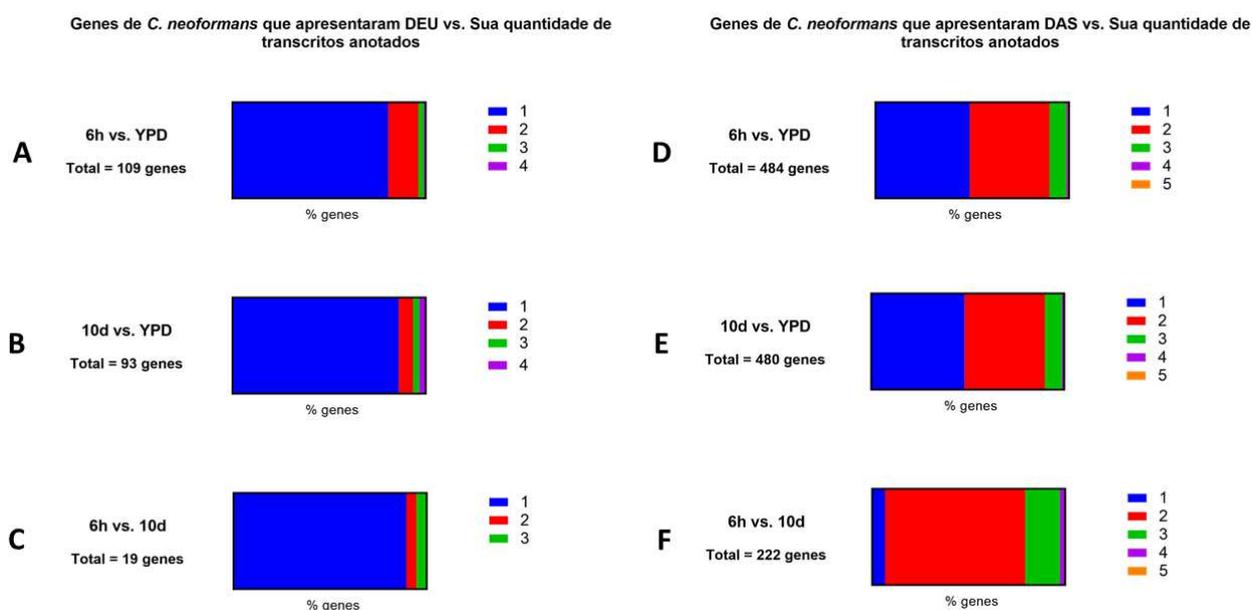


Figura 12: Porcentagem de genes de *C. neoformans* que apresentaram DEU (A), (B) e (C) e DAS (D), (E), (F), em relação à quantidade de transcritos anotados nas três comparações estudadas. Observa-se uma maior quantidade de genes com apenas um transcrito anotado na análise DEU e uma maior quantidade de genes com dois ou mais transcritos anotados na análise DAS.

Como a quantidade de íntrons é importante para análises de *splicing* alternativo, foi realizada uma análise da quantidade de íntrons presentes nos genes que apresentaram DEU e DAS em cada comparação estudada. Nas análises relacionadas ao número de íntrons em 6h vs. YPD (Figura 13A), observou-se 94 genes com 1 a 10 íntrons (86.24%), 13 com 11 a 20 íntrons (11.93%) e 2 genes com 21 a 30 íntrons (1.83%). Na comparação 10d vs. YPD observou-se 81 genes com 1 a 10 íntrons (87.10%), 10 genes com 11 a 20 íntrons (10.74%), 1 gene com 21 a 30 íntrons (1.08%) e 1 gene com 41 a 50 íntrons (1.08%), conforme a figura 13B. Já na comparação 6h vs. 10d, tem-se 18 genes com 1 a 10 íntrons (94.74%) e apenas 1 gene com 11 a 20 íntrons (5.26%) (Figura 13C).

Um padrão parecido é encontrado ao se examinar a quantidade de íntrons presentes nos genes que apresentaram DAS: 352 genes com 1 a 10 íntrons (72.73%), 114 com 11 a 20 íntrons (23.55%) e 14 genes com 21 a 30 íntrons (2.9%) e 4 genes com mais de 31 íntrons (0.82%) na comparação entre 6h e YPD (Figura 13D). Já na comparação 10d vs. YPD observou-se 350 genes com 1 a 10 íntrons (72.92%), 112 genes com 11 a 20 íntrons (23.33%), 14 genes com 21 a 30 íntrons (2.92%) e 4 genes com mais de 31 íntrons (0.83%), conforme a figura 13E. Por fim, na comparação 6h

vs. 10d (Figura 13F), tem-se 150 genes com 1 a 10 íntrons (67.57%), 62 com 11 a 20 íntrons (27.93%) e 10 genes com 21 a 30 íntrons (4.5%).

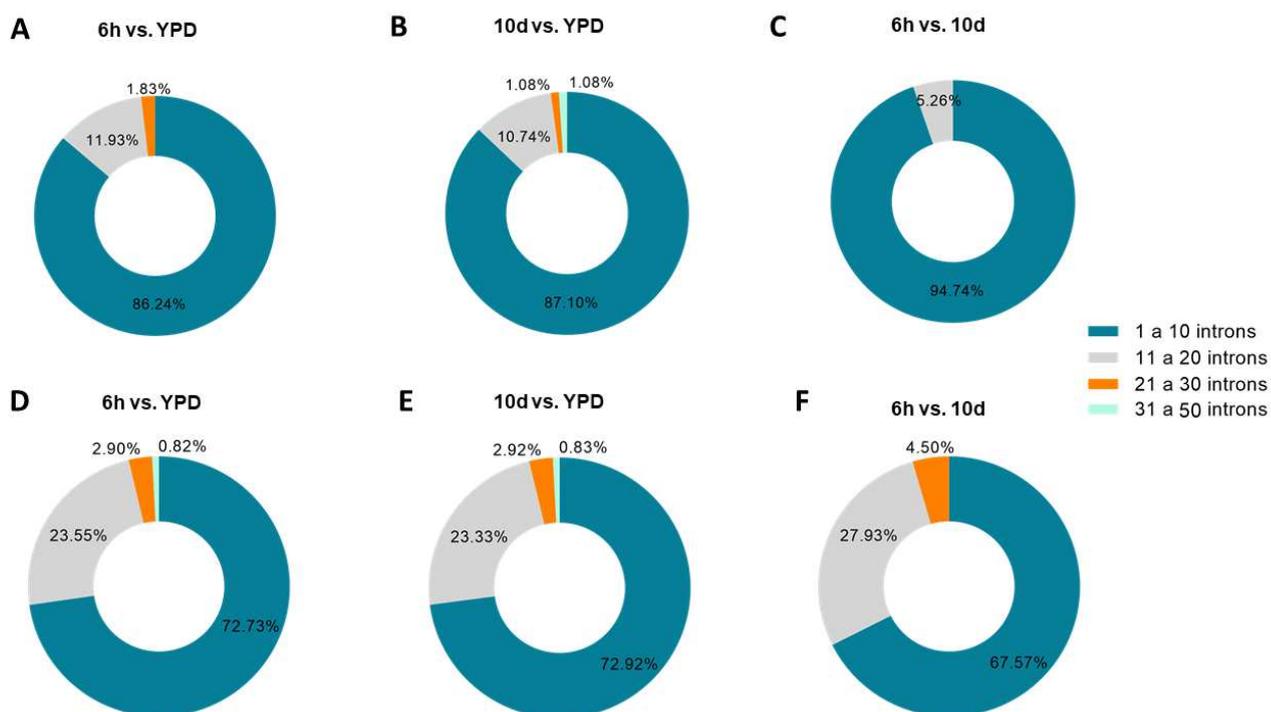


Figura 13: Relação entre a porcentagem de genes de *C. neoformans* que apresentaram DEU (A-C) e DAS (D-F), considerando os genes nas comparações: 6h vs. YPD, 6h vs. 10d e 10d vs. YPD. Observa-se que a maioria dos genes possui de 1 a 10 íntrons.

5.3.1.3. Identificação e Enriquecimento funcional (GO – Gene Ontology) dos genes que apresentaram DEU ou DAS

Analisando os dados disponíveis nos bancos de dados FungiDB e Ensembl Fungi, também foram realizadas análises funcionais para os genes que apresentaram DEU e DAS, separadamente. Tais investigações permitiram classificar os genes quanto ao tipo de transcrito que codificam – proteína anotada (de função descrita), proteína hipotética (sem função descrita), ou produto inespecífico (geralmente um RNA não codificante: ncRNA). A Tabela 6 mostra a distribuição geral dos 221 genes que apresentaram DEU nas três comparações estudadas, quanto ao tipo de classificação.

Tabela 6: Quantidade de genes de *C. neoformans* que apresentaram DEU classificados em relação à anotação.

Anotação	6h vs. YPD	10d vs. YPD	6h vs. 10d	TOTAL
Proteína hipotética	42	33	6	81
Proteína anotada	66	56	12	134
Produto inespecífico	1	4	1	6
TOTAL	109	93	19	221

Dos 109 genes analisados na condição 6h vs. YPD, 66 foram identificados como codificando proteínas anotadas, 42 codificam proteínas hipotéticas e 1 codifica um produto inespecífico (Tabela 6). Considerando o número total, estes valores correspondem a 60.55%, 38.53% e 0,92%, conforme a Figura 14A. Dos 93 genes analisados na condição 10d vs. YPD, 56 foram identificados como codificando proteínas anotadas, 33 codificam proteínas hipotéticas e 4 codificam produtos inespecíficos (Tabela 6). Considerando o número total, estes valores correspondem a 60.22%, 35.48% e 4.30%, conforme a Figura 14B. Já na condição 6h vs. 10d, dos 19 genes, 12 são proteínas anotadas, 6 são proteínas hipotéticas e 1 codifica um produto inespecífico (Tabela 6). Considerando o número total, estes valores correspondem a 63.16%, 31.58% e 5.26%, conforme a Figura 14C.

A análise funcional relacionada aos genes que apresentam DAS demonstrou percentuais parecidos com os genes com DEU, apesar da quantidade de genes ser muito mais expressiva nas análises de DAS. A Tabela 7 mostra a distribuição geral dos 1186 genes que apresentaram DAS nas três comparações estudadas, quanto à classificação.

Tabela 7: Quantidade de genes de *C. neoformans* que apresentaram AS classificados em relação à anotação.

Anotação	6h vs. YPD	10d vs. YPD	6h vs. 10d	TOTAL
Proteína Hipotética	199	198	113	510
Proteína anotada	278	275	109	662
Produto inespecífico	7	7	0	14

TOTAL	484	480	222	1186
--------------	-----	-----	-----	------

Dos 484 genes analisados na condição 6h vs. YPD, 278 foram identificados como codificando proteínas anotadas, 199 codificam proteínas hipotéticas e 7 codificam produtos inespecíficos (Tabela 7). Considerando o número total, estes valores correspondem a 57.44%, 41.12% e 1.44%, respectivamente e conforme a Figura 14D. Dos 480 genes analisados na condição 10d vs. YPD, 275 genes foram identificados como codificando proteínas anotadas, 198 codificam proteínas hipotéticas e 7 codificam produtos inespecíficos (Tabela 7). Considerando o número total, estes valores correspondem a 57.30%, 41.25% e 1.45%, conforme a Figura 14E. Já na condição 6h vs. 10d, dos 222 genes, 109 são proteínas anotadas e 113 são proteínas hipotéticas (Tabela 7). Considerando o número total, estes valores correspondem a 49.1% e 50.9%, conforme a Figura 14F.

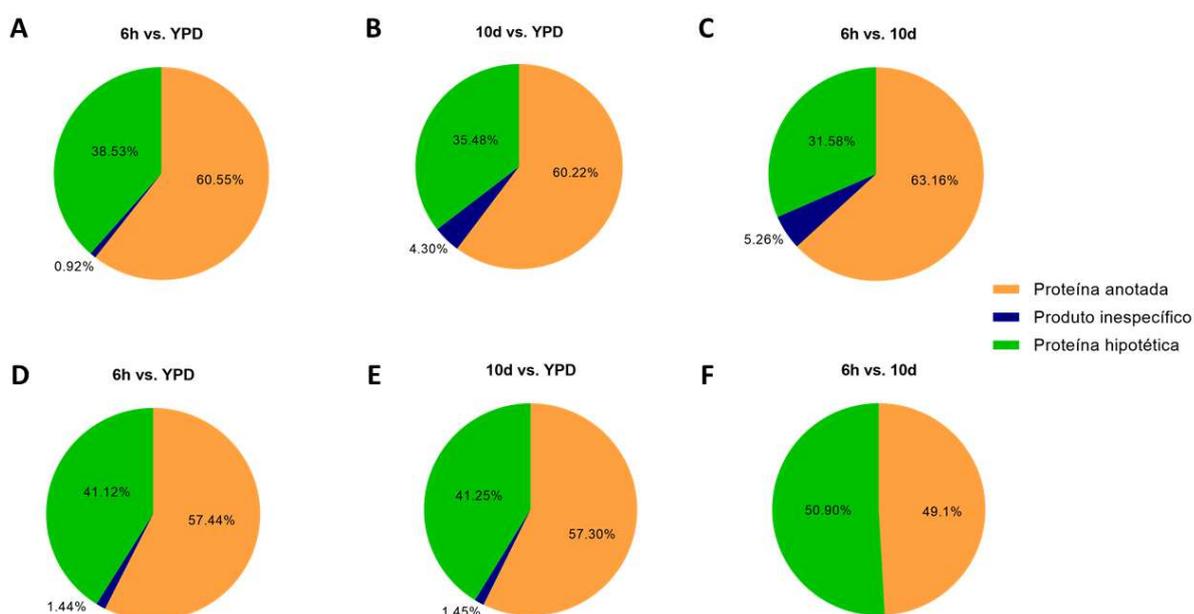


Figura 14: Porcentagem de genes que codificam Proteínas anotadas, Proteínas hipotéticas ou Produto inespecífico, dentre os genes de *C. neoformans* que apresentaram DEU (A-C) e DAS (D-F), nas comparações estudadas. Observa-se que, nas três comparações das duas análises, têm-se que a maioria dos genes codifica uma proteína anotada, com exceção da comparação 6h vs. 10d na análise DAS, em que a maioria dos genes codifica uma proteína hipotética.

Por fim, a partir dos genes que possuem função anotada (conhecida) dentre aqueles que apresentaram DEU em cada comparação estudada, foi realizada uma análise de enriquecimento funcional baseada em ontologia genética (GO), considerando os processos biológicos nos quais os genes estão envolvidos. Dessa forma, foram utilizados 66 genes na comparação 6h vs. YPD, 56 na comparação 10d vs. YPD e 12 na 6h vs. 10d, como descrito acima. Nas análises de enriquecimento com base nos genes que apresentaram DAS, foram utilizados 278 genes na comparação 6h vs. YPD, 275 aos 10d vs. YPD e 109 na comparação 6h vs. 10d e, como descrito acima (Tabela 7).

A análise baseada em ontologia genética (GO) permitiu identificar os processos biológicos enriquecidos nos quais os genes estão envolvidos. Os gráficos representando as categorias funcionais mais representativas dos genes que apresentaram DEU e DAS nas três comparações analisadas estão expostos nas Figuras 15, 16 e 17, para cada uma das comparações realizadas.

Às 6h vs. YPD da análise DEU se destaca o Processo biossintético de compostos organonitrogenados, com 14 de seus genes apresentando DEU nessa comparação. Outras categorias interessantes representadas foram: Resposta celular à estímulos ambientais, com 4 de seus genes apresentando DEU, Processo biossintético de pigmento, também com 4 genes e Homeostase iônica e Cadeia respiratória de elétrons, com 2 genes cada (Figura 15A). Ao observar os processos biológicos relevantes dos genes que apresentaram DAS às 6h vs. YPD (Figura 15B), notou-se que o mais expressivo é o de Transporte, com cerca de 60 genes presentes, seguido pelo Processo biossintético de compostos contendo bases nitrogenadas, com 26 genes. Também se destacam o processo de crescimento e o de resposta à estímulos, com 4 genes – processos, estes, que são altamente importantes para a adaptação inicial do patógeno ao hospedeiro e que também estão presentes nos processos biológicos relevantes nas análises de DEU (Figura 15A).

Classes funcionais mais representativas dos genes de *C. neoformans* que apresentaram AS às 6h vs. YPD

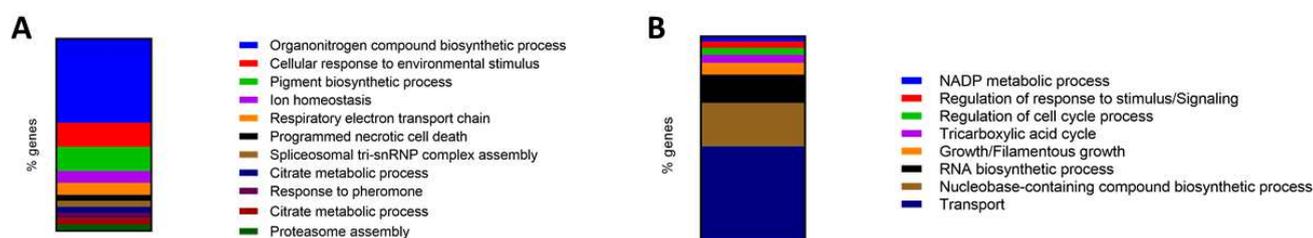


Figura 15: Categorização funcional baseada em processos biológicos (GO) dos genes de *C. neoformans* que apresentaram: (A) DEU e (B) DAS, na comparação 6h vs. YPD. A maioria dos genes com DEU está relacionada à biossíntese de compostos organonitrogenados, enquanto a maioria dos genes com DAS estão relacionados com processos de transporte.

Na comparação 10d vs. YPD, os processos mais relevantes são Resposta ao estresse salino, com 5 de seus genes apresentando DEU nesta comparação. Também se destacam Homeostase iônica, Montagem do ribossomo e Cadeia respiratória de transporte de elétrons, com 2 genes de cada sofrendo DEU (Figura 16A). Na mesma comparação, mas considerando os genes que apresentaram DAS (Figura 16B), os processos mais relevantes são muito similares aos apresentados na comparação de 6h vs. YPD, isso porque, como descrito anteriormente (Figura 7), os genes que apresentaram DAS nas duas comparações entre momentos de infecção e o controle são os mesmos.

Classes funcionais mais representativas dos genes de *C. neoformans* que apresentaram AS aos 10d vs. YPD

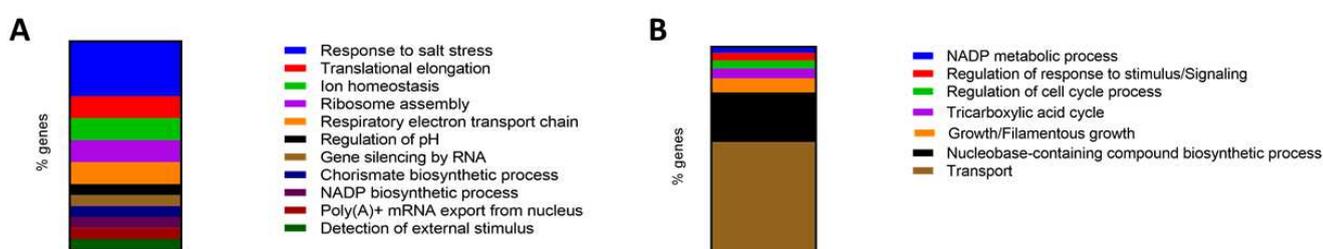


Figura 16: Categorização funcional baseada em processos biológicos (GO) dos genes de *C. neoformans* que apresentaram: (A) DEU e (B) DAS, na comparação 10d vs. YPD. A maioria dos genes com DEU está relacionada à resposta ao estresse salino, enquanto a maioria dos genes com DAS estão relacionados com processos de transporte.

Na comparação 6h vs. 10d se destacam as categorias de Processo bio sintético do ácido carboxílico, com 2 de seus genes apresentando DEU nesta comparação, e Silenciamento de genes por RNA e Montagem do ribossomo, com 1 gene (Figura 17A). Ao se observar os genes com DAS, os processos biológicos mais significativos foram os de Regulação da biossíntese de RNA – com 15 genes – e Regulação da organização da cápsula polissacarídica, com 8 genes. É interessante observar, neste caso, a quantidade de processos relativos à regulação de outros processos, o que pode evidenciar a importância do AS durante a infecção (Figura 17B).

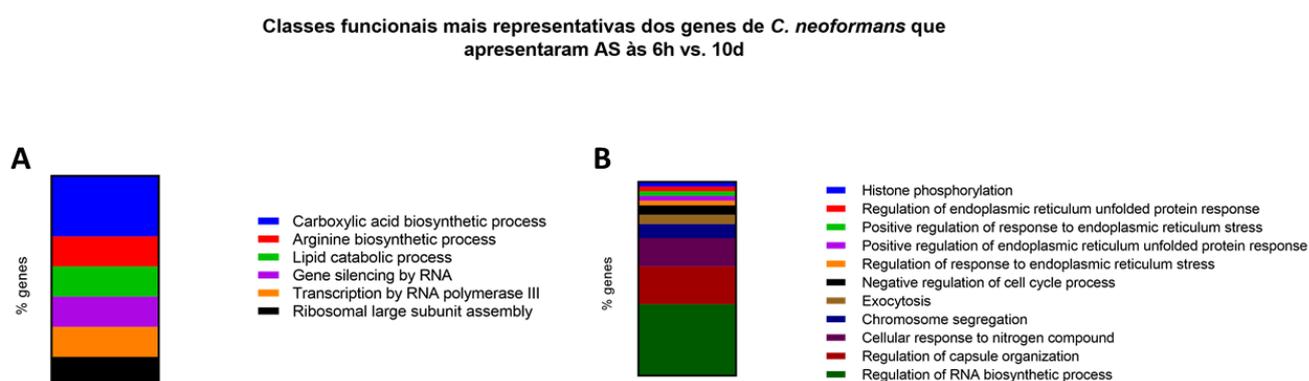


Figura 17: Categorização funcional baseada em processos biológicos (GO) dos genes de *C. neoformans* que apresentaram: (A) DEU e (B) DAS, na comparação 6h vs. 10d. A maioria dos genes com DEU está relacionada à biossíntese de ácido carboxílico, enquanto a maioria dos genes com DAS estão relacionados à regulação da biossíntese de RNA.

5.4 Genes que apresentam DAS e são diferencialmente expressos (DE) nas condições estudadas.

Com base na relevância dos processos biológicos descritos para a sobrevivência do fungo no contexto de infecções, foi avaliado se os genes que apresentam DAS estão diferencialmente expressos nas mesmas comparações. Essa verificação se deu com base nas tabelas de genes diferencialmente expressos (DEG - *Differentially Expressed Genes*) fornecidas por Freitas e colaboradores (2022). Um estudo prévio do nosso grupo avaliou os DEG em *C. neoformans* nas mesmas condições experimentais deste trabalho (FREITAS et al., 2022). Este tipo de análise é relevante no contexto deste trabalho, por permitir a associação entre o evento de AS ocorrido com um gene, com sua possível consequência nos níveis de expressão, uma vez que

o AS age justamente no transcrito, podendo afetar sua estrutura e, conseqüentemente, sua expressão – positiva ou negativamente.

Assim, a lista com os 459 genes que apresentaram DAS na comparação 6h vs. YPD foi comparada com os 399 genes regulados positivamente e com os 336 genes regulados negativamente na mesma comparação. Da mesma forma, foram comparadas a lista dos 455 genes que apresentaram DAS em 10d vs. YPD com os 442 genes regulados positivamente e com os 323 regulados negativamente na mesma comparação. Por fim, os 210 genes que sofreram DAS em 6h vs. 10d, foram contrastados com os 326 regulados positivamente e com os 2 regulados negativamente nesta comparação.

Dos genes que apresentaram DAS na comparação 6h vs. YPD, 34 estão modulados positivamente e 41 negativamente (Figura 18). Já na comparação 10d vs. YPD, 31 genes com DAS estão regulados positivamente e 48 negativamente nesta comparação (Figura 19). Por fim, o que se nota na comparação 6h vs. 10d são 9 genes com DAS que também estão regulados positivamente, enquanto 2 nenhum gene com DAS é regulado negativamente nesta comparação (Figura 20).

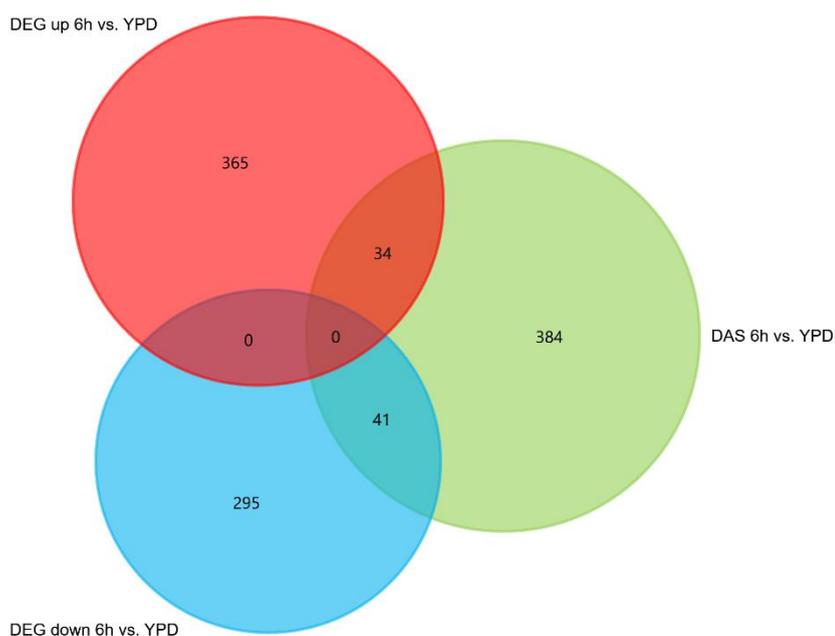


Figura 18: Diagrama de Venn demonstrando o número de genes de *C. neoformans* que apresentaram DAS (verde) e apresentaram expressão diferencial positiva (vermelho) e negativa (azul claro) na comparação 6h vs. YPD.

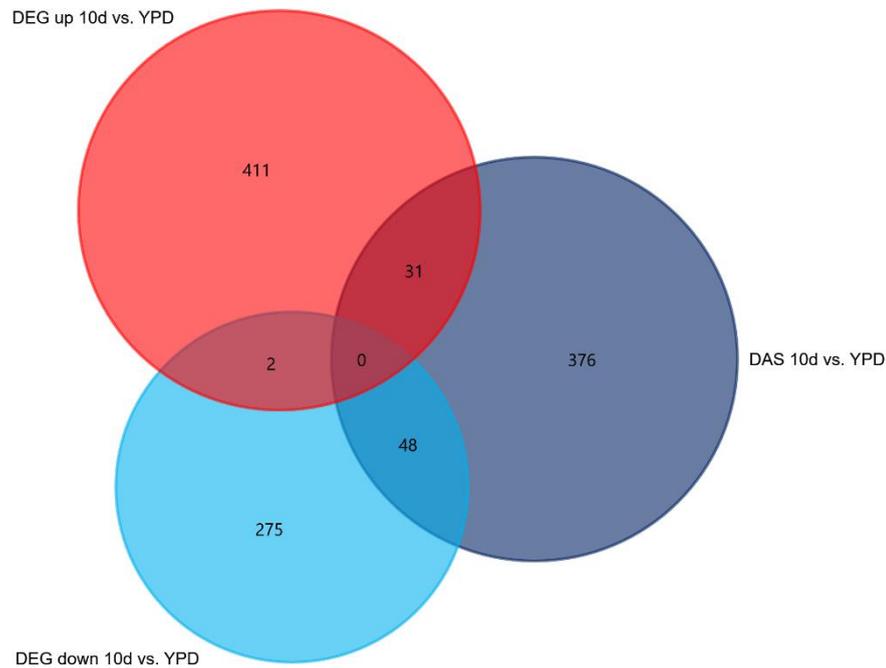


Figura 19: Diagrama de Venn demonstrando o número de genes de *C. neoformans* que apresentaram DAS (azul escuro) e que apresentaram expressão diferencial positiva (vermelho) e expressão diferencial negativa (azul claro) na comparação 10d vs. YPD.

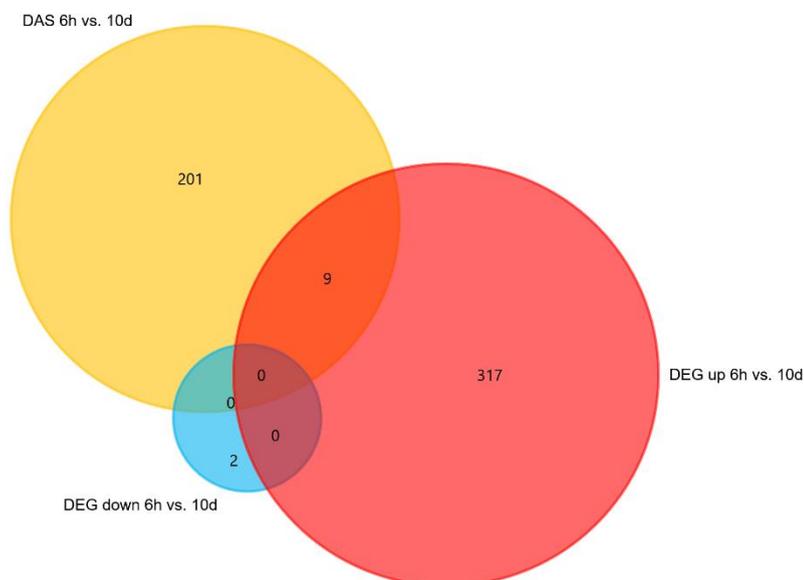


Figura 20: Diagrama de Venn demonstrando o número de genes de *C. neoformans* que apresentaram DAS (amarelo) e apresentaram expressão diferencial positiva (vermelho) e negativa (azul claro) na comparação 6h vs. 10d.

Após esta etapa, foram avaliadas também as categorias funcionais representadas pelos genes apresentando DAS e com regulação diferencial entre as condições

estudadas. Portanto, a partir dos genes que sofreram DAS e que se encontram diferencialmente expressos na mesma condição, foi realizada uma análise de enriquecimento funcional via KEGG. Na análise, foram identificadas diversas vias relevantes para a condição de comparação 6h vs. YPD, se destacando a via metabólica da alanina, aspartato e glutamato, que é regulada positivamente às 6 horas de infecção e que possui dois de seus genes (CNAG_00026 - *kynurenine aminotransferase* e CNAG_05389 - *phinganine-1-phosphate aldolase*) com eventos de AS do tipo IR e ES. Para a comparação 10d vs. YPD, a via mais representada e regulada positivamente aos 10 dias é a do metabolismo de glicerofosfolipídeos, com 4 de seus genes (CNAG_00936 - *lipid particle protein*, CNAG_04408 - *choline kinase*, CNAG_04869 - *para-nitrobenzyl esterase*, e CNAG_05851 - *glycerol transporter*) apresentando AS dos tipos A3'SS, ES, ES e ES, respectivamente. Na comparação 6h vs. 10d, a via mais relevante se relaciona com o metabolismo iônico, pelo gene CTR4 que codifica um transportador de cobre (*Copper uptake transporter* - CNAG_00979), que está regulado positivamente aos 10d, em relação às 6h, e que consta nas análises como sofrendo AS do tipo A3'SS.

Uma vez que os genes que apresentam AS estão envolvidos em processos de importância considerável para a adaptação e sobrevivência do fungo no contexto da infecção, pode-se considerar que essas alterações causadas pelo AS podem ter contribuído para o fenótipo adaptado à sobrevivência e virulência de *C. neoformans* ao longo da infecção.

6. DISCUSSÃO

Cryptococcus neoformans, patógeno de abrangência mundial e causador da criptococose, é um fungo leveduriforme ambiental oportunista, que infecta hospedeiros humanos imunocomprometidos após aspiração acidental, causando pneumonias e casos de meningoencefalite e sendo responsável por altas taxas de mortalidade (SABIITI & MAY, 2012; KWON-CHUNG *et al.*, 2014; KHATIB *et al.*, 2021). Esta levedura é conhecida, dentre outras características, por seus fatores de virulência – entre eles, a cápsula polissacarídica, que envolve o fungo e o protege do ambiente e da resposta imune do hospedeiro (KOZEL & MASTROIANNI, 1976).

Como patógeno oportunista, *C. neoformans* precisa se adaptar ao organismo de seu hospedeiro, uma vez que este ambiente é altamente estressante e desafiador à sobrevivência do fungo, apresentando baixas taxas de nutrientes, temperatura mais alta e, claro, as ações do sistema imune do hospedeiro, que tem como objetivo justamente eliminar o patógeno. O comportamento de *C. neoformans* ao longo de processos infecciosos já foram estudados diversas vezes, com foco em diferentes mecanismos, especialmente por meio de análises transcriptômicas (RUDE *et al.*, 2002; STEEN *et al.*, 2003; FAN *et al.*, 2003; HU *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2019; YU *et al.*, 2021; FREITAS *et al.*, 2022). Tais trabalhos apresentam informações importantíssimas, contudo, elas não abordam um mecanismo muito importante de regulação em eucariotos, chamado de *Splicing* alternativo (AS), que permite que mais de um transcrito seja produzido a partir de um mesmo gene e que pode afetar o transcriptoma do fungo (SMITH & KELLER, 2013; LE *et al.*, 2015).

No contexto da infecção, o fungo está sob constante pressão externa, sendo necessário que haja mudanças metabólicas frequentes, mediadas por mecanismos de controle da expressão gênica, a fim de perceber e se adaptar ao ambiente, para que a sobrevivência seja garantida (NEVES-DA-ROCHA *et al.*, 2019). Desta maneira, o AS age na regulação a nível do transcrito, podendo aumentar ou diminuir sua expressão, além de poder modificar estruturalmente a proteína. Observa-se, então, que o AS é um mecanismo modulador muito importante em eucariotos e que, por ser dependente das condições em que o patógeno se encontra, pode modificar significativamente determinados processos ocorridos ao longo da infecção. Desta

forma, neste estudo foi analisada por meio de RNA-seq, a ocorrência de eventos de AS em dois momentos distintos de infecção em modelo murino: 6 horas (6h), momento inicial da infecção, e 10 dias (10d), momento de infecção tardia. Descobriu-se que, em condições de infecção, há a ocorrência de um grande número eventos de *splicing* alternativo diferencial, quando se compara com o fungo em condições de não-infecção.

Os dados provenientes do sequenciamento duplo e do mapeamento dos *reads* aos dois genomas de referência (*Cryptococcus neoformans* e *Mus musculus*) comprovam a boa qualidade dos processos realizados: o sequenciamento apresenta cerca de 99,9% de confiabilidade (ILLUMINA, 2011) e os dados de mapeamento indicam o que é esperado em análises de RNA-seq duplo – menor taxa de mapeamento de *reads* ao menor genoma. Outros trabalhos que fazem uso deste tipo de metodologia também apresentam maior cobertura dos *reads* provenientes do organismo com maior proporção de transcritos – geralmente, o hospedeiro (SEELBINDER *et al.*, 2020).

Após a etapa de conferência da qualidade dos dados brutos, inicialmente, foram realizadas duas análises: (a) de uso diferencial de éxons (DEU), que indicou aqueles genes que apresentaram diferença estatística na expressão de pelo menos um de seus éxons, quando se comparou as condições de: infecção inicial (6h) vs. fungo em não infecção (YPD), infecção tardia (10d) vs. fungo em não infecção (YPD) e infecção inicial (6h) vs. infecção tardia (10d); e (b) *splicing* alternativo diferencial (DAS), que indicou aqueles genes que apresentaram padrões distintos de *splicing* de seus éxons, quando as mesmas comparações indicadas acima foram realizadas. Descobriu-se que, apesar de a quantidade de genes apresentando DAS ser expressivamente maior que os com DEU nas três comparações estudadas (1124>221), há uma similaridade entre as características destes, como uma maior quantidade de genes apresentando DEU e DAS nas comparações entre condições de infecção e de não-infecção (6h vs. YPD e 10d vs. YPD). Estas taxas são condizentes com o que se espera, uma vez que o previsto é que haja maior diferença entre as condições em que o fungo se encontra em condições muito distintas, ou seja, justamente entre as condições iniciais e tardias de infecção, em comparação com a condição controle (YPD), uma vez que ela representa o fungo no tempo 0 de infecção, ou seja, antes de entrar no corpo do hospedeiro.

Outras similaridades dizem respeito à localização genômica e número de íntrons presentes nos genes resultantes das duas análises – nas duas investigações há uma distribuição relativamente coesa dos genes ao longo do genoma, com exceção da análise de DAS, que não apontou nenhum gene mitocondrial, possivelmente causadas por diferenças metodológicas existentes entre as duas análises, descritas no tópico 4.5.2 (ANDERS *et al.*, 2012; SHEN *et al.*, 2014). Já a avaliação quanto ao número de íntrons revela um padrão muito similar nas duas análises: a maioria dos genes resultantes das duas análises e nas três condições possuem menos de 10 íntrons – dados que estão de acordo com o que se encontra quando se considera o genoma completo, assim como relatado por Janbon e colaboradores, que descobriram que a média de íntrons por gene de *C. neoformans* é 5.7 (JANBON *et al.*, 2014). Ademais, é interessante mencionar que, tanto nos resultados de DEU, quanto de DAS, o gene com o maior número de íntrons – CNAG_03355, que codifica uma quinase (TCO4) envolvida em processos de resposta ao ambiente e de virulência (BAHN *et al.*, 2006) – se faz presente, com seus 43 éxons e 42 íntrons.

Ao investigar o perfil da quantidade anotada, em bancos de dados, de transcritos codificados por cada gene que se apresentou nas duas análises, tem-se uma diferença importante entre os dois resultados: a maioria dos genes que apresentaram DEU nas comparações analisadas possui apenas um transcrito anotado, enquanto isso não acontece com os genes que apresentaram DAS – sua maioria já apresenta dois ou mais transcritos anotados, apesar de, ainda assim, muitos genes com apenas um transcrito anotado serem indicados como apresentando DAS. É importante ressaltar que este tipo de investigação se faz muito relevante em um estudo como este, em que o objetivo é analisar a ocorrência de eventos de *splicing* alternativo, uma vez que mais de um transcrito na anotação implica em um evento de AS já conhecido e, dessa maneira, é possível distinguir aqueles genes que já possuem eventos de AS anotados. Contudo, esta diferença existente entre os dois resultados pode ser explicada pela metodologia utilizada em cada uma das análises, uma vez que o Uso diferencial e éxons (DEU) calcula e diferencia apenas aqueles genes que tiveram uma expressão muito mais pronunciada de um (ou mais) de seus éxons, que pode ser causada por *splicing* alternativo, mas também por outro tipo de regulação pós-transcricional. O rMATS, por sua vez, já é capaz de calcular a correlação dos níveis da inclusão dos éxon, considerando a variabilidade individual das inclusões de cada

éxon em cada replicata, bem como entre cada uma delas. Desta maneira, a diferença apresentada no número de transcritos codificados pelos genes resultantes das duas análises pode se dar pelo fato de a maioria dos genes que apresentam DEU estarem, na verdade, passando por processos regulatórios distintos do *splicing* alternativo. Assim, a expressão exônica pode ser regulada de outra forma que não a produção de um transcrito alternativo ainda não anotado, como, por exemplo, pela presença de sítios alternativos de poliadenilação – outro mecanismo de regulação pós-transcricional que consiste na clivagem da extremidade 3' e adição da cauda poli-A em sítios não convencionais, podendo alterar a estrutura e estabilidade do mRNA maduro de forma distinta ao AS (SACHS, 1990; PROUDFOOT, 2011). Em contrapartida, a probabilidade de haver novos sítios de *splicing* nos genes resultantes das análises DAS é maior, visto que esta metodologia é mais apropriada para tal (ANDERS *et al.*, 2012; SHEN *et al.*, 2012). Entretanto, para verificar tais sítios, seriam necessárias diversas outras metodologias, com análises estruturais mais específicas e direcionadas, a fim de confirmar os novos eventos e evitar falsos-positivos.

Juntamente com as análises de identificação dos genes que apresentaram DEU e DAS, foram analisadas as porcentagens de genes que possuíam transcritos anotados do tipo (a) proteína anotada, (b) proteína hipotética e (c) produto inespecífico. Comparando as duas análises, têm-se, novamente, um padrão parecido dentro de cada comparação, com a maioria se tratando de genes codificantes de proteínas anotadas (cerca de 60% na análise DEU e cerca de 55% na análise DAS). Ademais, observa-se nas duas análises que a minoria corresponde a genes que codificam produtos inespecíficos, mais especificamente, RNAs não codificantes (ncRNAs). Este tipo de transcrito, como o próprio nome já revela, não codifica nenhuma proteína e, sim, diversos tipos de RNA que atuam expressivamente em processos de regulação gênica pré e pós-transcricional em eucariotos (BARTEL, 2004; HASHIMOTO *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2019). Os miRNAs (micro RNAs) são um exemplo importante de ncRNA, por atuarem no silenciamento de genes pós-transcrição, pela associação com o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) e da ligação à sequências específicas na região 3' UTR dos mRNAs, impedindo a tradução ou promovendo a degradação do mRNA alvo (BARTEL, 2004; JIANG *et al.*, 2012). Dessa forma, nossas análises confirmam que os ncRNAs, moléculas tão relevantes na regulação pós-transcricional, também são alvos de regulação, através do *splicing* alternativo.

Entretanto, como o foco deste trabalho foi caracterizar funcionalmente e investigar possíveis consequências do AS para o patógeno, esses genes que codificam produtos inespecíficos e proteínas hipotéticas não foram considerados nas análises descritas abaixo, que têm relação com a função e processo biológico nos quais os genes que apresentaram DEU e DAS estão envolvidos. Estas investigações revelaram um padrão similar entre as duas análises, com poucas distinções: a maioria dos genes que apresentaram DEU às 6h em comparação com YPD estão relacionados com processos biossintéticos de compostos nitrogenados, enquanto os genes que apresentaram DAS se encontram envolvidos em processos de transporte, logo seguidos por genes envolvidos na produção de RNA e outros compostos com ácidos nucleicos. Ainda é possível perceber que vias relacionadas à resposta à estímulos externos estão presentes nas duas análises. Apesar de não poder correlacionar diretamente esses dados com os de expressão diferencial de genes (DEG), tais processos biológicos apresentados por esses genes são congruentes com o processo fisiológico pelo qual o patógeno passa ao longo da interação com o hospedeiro, uma vez que, em momentos iniciais de infecção, o fungo está bioquimicamente focado em se adaptar ao ambiente hostil que é o corpo do hospedeiro. Para isso, ele necessita reconhecer o ambiente em que está e se reproduzir, a fim de garantir a sobrevivência da sua linhagem (STEEN *et al.*, 2003; FREITAS *et al.*, 2022). Dessa forma, se fazem importantes vias de transporte e de produção de compostos celulares, uma vez que o crescimento celular nesta etapa é significativa. Na comparação entre genes com DEU e DAS na infecção tardia (10d) vs. o controle, já existem poucos processos em comum, se destacando somente o processo metabólico de NADP e detecção e resposta a estímulos externos, também em consoante com o esperado, uma vez que também são processos relacionados à sobrevivência de *C. neoformans* no ambiente hostil representado pela infecção aos 10 dias, em comparação com o controle (LIEW *et al.*, 2016). Finalmente, os processos enriquecidos na comparação entre o momento inicial (6h) e tardio (10d) da infecção podem parecer muito distintos quando se considera os processos relacionados ao DEU e ao DAS. Contudo, a regulação da organização capsular e o processo de biossíntese de arginina acabam por unificar essas duas análises, de certa forma. Estudos de investigação do transcriptoma de *C. neoformans* durante o processo infeccioso revelaram que genes relacionados à formação de cápsula se mostram como muito expressos em estágios tardios de infecção (FREITAS

et al., 2022). Este processo, por ser muito dispendioso energeticamente, acaba por necessitar de constante energia, que se mostra como escassa no ambiente pulmonar em que o fungo se encontra, principalmente pela baixa concentração de glicose. Dessa forma, o que se tem é uma regulação no metabolismo do patógeno, para que ele seja capaz de conseguir energia através de processos alternativos, como vias relacionadas ao acetato, lipídeos e aminoácidos, como a arginina (KRONSTAD *et al.*, 2012).

Com base nas questões metodológicas mencionadas acima, as investigações de eventos de *Splicing* alternativo se seguiram considerando apenas os resultados de *Splicing* Alternativo Diferencial (DAS). Consoante com o observado por Janbon e colaboradores em 2014 em *C. neoformans* var. *grubii*, alvo deste trabalho, a maioria dos eventos de AS ocorrem por consequência de ES, A3'SS, RI e A5'SS (JANBON *et al.*, 2014). Este mesmo padrão de AS já foi descrito para *C. neoformans* var. *neoformans* (LOFTUS *et al.*, 2005).

Quando se analisa mais profundamente os resultados provenientes desta análise, mais especificamente, os genes que apresentam cada tipo de AS (IR, ES, MXE, A3'SS E A5'SS), se observa um padrão muito similar entre as comparações entre condições de infecção e a condição controle (6h vs. YPD e 10d vs. YPD). Além disso, o evento mais comum quando se compara condições de infecção, seja ela inicial (6h) ou tardia (10d), com a condição de não-infecção (YPD), é o Uso alternativo de éxons (ES) – dado que conflita com o que se encontra na literatura, que relata que o evento mais comum de *splicing* alternativo na espécie e em outros fungos é a retenção de íntrons (IR), apesar de este evento não causar grandes impactos ao proteoma da espécie e, sim, modificar a expressão (LOFTUS *et al.*, 2015; GRÜTZMANN *et al.* 2014; GONZALEZ-HILARION *et al.*, 2016, SIEBER *et al.*, 2018). Contudo, esta diferença pode ser explicada pela metodologia deste trabalho, que é inovadora, por investigar os eventos de *splicing* durante uma infecção *in vivo* (em modelo murino), enquanto os trabalhos encontrados na literatura fazem este tipo de investigação *in vitro* e *ex vivo* (em macrófagos). Portanto, nesta ótica, este resultado muito expressivo de eventos de ES apresentado nas comparações entre condições de infecção em hospedeiro murino e o controle pode ser explicado pela enorme diferença existente entre os dois ambientes, que leva o patógeno à necessidade de se adaptar ao ambiente estressante

em que se encontra no alvéolo pulmonar do camundongo, chegando ao ponto de haver a necessidade de modulação de seus fatores de virulência (MOMIM & WEBB, 2021). Assim sendo, os eventos de ES podem ocorrer como forma de regular os diversos genes em que este processo ocorre, já que, com a exclusão de um éxon da sequência madura do mRNA, este pode ter sua fase de leitura modificada e, assim, afetar a transcrição, gerando produtos distintos, que podem ser mais ou menos expressos. Esta hipótese ainda ganha força quando se analisa a quantidade de eventos de ES e IR quando se comparou as duas condições de infecção (6h e 10d): a quantidade de eventos ES é menor que a de IR – o que indica que, por estes dois ambientes não apresentarem tantas diferenças quanto àquelas apresentadas nas comparações entre condições de infecção e de não-infecção, o número de eventos de ES não se faz mais tão necessário e quanto nas primeiras comparações. De qualquer maneira, ainda são necessários mais estudos a fim de elucidar as taxas de eventos de ES, bem como da função deste mecanismo nos contextos discutidos, uma vez que há uma carência de estudos relativos à este evento específico de AS, pela maioria dos trabalhos encontrados na literatura fazerem maior referência à retenção de íntrons (GOEBELS *et al.*, 2013; GONZALEZ-HILARION *et al.*, 2016; JANBON, 2018; MUZAFAR *et al.*, 2021).

Os resultados também apontaram a presença de diferentes transcritos de um mesmo gene apresentando um mesmo evento de AS, o que poderia significar que um mesmo gene pode apresentar um mesmo tipo de evento, em íntrons ou éxons distintos. Dessa forma, foi utilizado o software IGV para a visualização das sequências destes genes “repetidos”, com o objetivo de confirmar esta hipótese. Dessa forma, foi permitida a descoberta de dois possíveis eventos de ES no gene CNAG_02751, ocorrendo em éxons distintos (Figuras 5 e 6). Esta observação é de grande importância, pois comprova que um mesmo gene pode apresentar eventos de AS de um mesmo tipo, em uma mesma condição. Entretanto, é importante discutir que, na exploração visual deste gene através do IGV, também foi possível identificar que existem muitos *reads* relativos aos dois éxons que são excluídos no YPD, o que implica em transcrição destes éxons nesta condição. Assim sendo, a hipótese apresentada é a de que, nesta condição, os éxons 3 e 6 são sim excluídos, mas não de todos os transcritos: também ocorre o *splicing* convencional, com a inclusão de todos os éxons deste gene – o que explicaria a quantidade significativa de junções

conectando os éxons 3 e 6 aos seus éxons laterais e, também, a expressividade dos *reads* mapeados à esses genes no YPD. Desta maneira, o que é provável que ocorra nesta condição é a produção de um transcrito convencional, com todos os éxons, e um ou mais transcritos que possuem: (a) exclusão dos éxons 3 e 6; (b) exclusão somente do éxon 3 e; (c) exclusão do éxon 6. Interessantemente, este gene, que codifica uma desidrogenase, se encontra regulado negativamente nas condições em que aparecem como apresentando este tipo de *splicing* alternativo, o que pode indicar que os eventos de ES foram os reguladores responsáveis por esta baixa expressão do gene CNAG_02751 na condição de não infecção (YPD), em comparação com as condições em que o ES não ocorre (infecção 6h e infecção 10d). Outra observação relacionada à este gene diz respeito à sua quantidade de transcritos: na anotação presente nos bancos de dados só existe um transcrito anotado e, caso se confirmem as hipóteses apresentadas acima, isso implicaria em um evento de AS ainda não anotado – descoberta de grande relevância realizada neste estudo. Desta maneira, se fazem necessários estudos estruturais mais aprofundados acerca deste gene, a fim de confirmar estes padrões de AS nesta condição e, assim, atualizar a anotação dos bancos de dados (JANBON *et al.*, 2014).

Ainda analisando os distintos padrões de AS apresentados pelos genes de *C. neoformans* nas comparações entre momentos de infecção e sem infecção, foi possível identificar genes que apresentaram eventos de AS distintos ao mesmo tempo, como o gene CNAG_05734, que codifica uma proteína relacionada aos processos de biogênese e organização da parede celular e que consta como apresentando IR e ES entre as duas condições de infecção e o controle (6h vs. YPD e 10d vs. YPD). A ocorrência simultânea de dois eventos de *splicing* alternativo já é documentada, inclusive em *S. cerevisiae* (SCHREIBER *et al.*, 2015). Ao analisar o gene em questão no IGV, observou-se que havia diferenças no padrão de expressão deste entre 6h e YPD, de forma que parecia haver retenção de íntrons na condição YPD, enquanto na condição de 6h isso não se fazia presente. Explorando os dados, descobriu-se que o gene em questão já possui dois transcritos em sua anotação, um contendo 6 e o outro, 8 éxons e é justamente nesta diferença que a Retenção de íntrons (RI) diferencial foi detectada: pelo padrão de expressão dos éxons e de suas junções, nota-se que às 6 horas de infecção parece haver apenas a expressão do segundo transcrito da anotação (de 8 éxons), enquanto na condição de não infecção,

há a expressão dos dois transcritos, de forma que a expressão do primeiro éxon do primeiro transcrito – por percorrer toda a região que seria correspondente aos éxons 1, 2 e 3 e aos íntrons 1 e 2 – mimetiza a retenção do íntron 2 do segundo transcrito (Figura 9). De qualquer maneira, é possível afirmar que um evento de *splicing* alternativo diferencial ocorre sim neste gene, nessas condições, uma vez que uma delas (6h) apresenta somente um transcrito, enquanto a outra (YPD), apresenta dois. Ademais a este evento de IR, o gene CNAG_05734 foi indicado como passando pelo processo de ES diferencial na comparação 6h vs. YPD. Ao analisar visualmente a estrutura dos transcritos de referência, observou-se uma exclusão do último íntron do gene, na condição 6h – condizente com o padrão de AS indicado pelo rMATS. Contudo, assim como ocorre com o gene CNAG_02751, este tipo de *splicing* alternativo não se encontra anotado, sendo interessante a confirmação deste padrão em experimentos futuros.

Apesar de apresentar dois tipos distintos de DAS na comparação entre infecção inicial e não-infecção, este gene não foi diferencialmente expresso nesta comparação. Este resultado reforça o entendimento que se tem sobre o *splicing* alternativo, principalmente à retenção de íntrons: este tipo de evento não costuma ser muito relacionado à grandes mudanças de expressão, apesar de já ser anotado que sua ocorrência é capaz de introduzir um *stop* códon e de mudar o *frame* de leitura de um transcrito (JANBON *et al.*, 2018; GONZALEZ-HILARION *et al.*, 2016). A importância dos íntrons está, na realidade, também relacionada com o seu *splicing*: Goebels e colaboradores, em 2013, caracterizaram uma das maiores vias de regulação realizada pelos íntrons – o *splicing* dessas regiões promove a exportação eficaz do mRNA para o citosol, de forma que a falta dos íntrons acarreta em exportação ineficiente do mRNA para fora do núcleo, com consequente degradação deste por nucleases. Tal degradação é desencadeada pela permanência do mRNA no núcleo, que ocorre pela falta da ligação do complexo EJC no mRNA – ligação esta que acontece somente com o *splicing* e que é necessário para a exportação desta molécula para fora do núcleo (GOEBELS *et al.*, 2013). Assim sendo, é importante discutir sobre o papel do AS, uma vez que, nem sempre ele acarretará em diferenças de expressão do seu gene alvo – podendo somente ocorrer sem modificar a proteína codificada pelo gene em questão, e podendo não possuir uma função regulatória, apesar de ter um papel de grande

importância nesse sentido (GOEBELS *et al.*, 2013; GONZALEZ-HILARION *et al.*, 2016; JANBON, 2018).

Com a finalidade de criar uma conexão maior entre os eventos de *splicing* alternativo diferencial e a regulação gênica que ocorre ao longo do processo de infecção, foi realizada uma análise de interseção entre os genes que se apresentaram com *splicing* alternativo diferencial (DAS) e como diferencialmente expressos (DE) nas mesmas condições. Tal estudo se fez possível baseado nas análises de genes diferencialmente expressos (DEG) em *C. neoformans* nas mesmas condições experimentais deste trabalho, realizadas previamente em nosso grupo (FREITAS *et al.*, 2022).

Os resultados desta etapa mostram que as comparações entre momentos de infecção e de não infecção com o controle (6h vs. YPD e 10d vs. YPD), são muito similares com relação à quantidade de genes que apresentam pelo menos um evento de *splicing* alternativo e que também são regulados na mesma condição – cerca de 30 são regulados positivamente (*up*) e 40 são regulados negativamente (*down*) nas condições de infecção, em comparação com a não-infecção. Já na comparação entre o momento de infecção inicial (6h) e tardia (10d), não existem genes que apresentam DAS e que são *down*-regulados, enquanto 9 são *up*. Em todos os casos, percebe-se uma grande quantidade de eventos de AS que, aparentemente, não trazem consequências regulatórias para o gene alvo no evento, uma vez que as interseções apresentam poucos genes. Contudo, como mencionado acima, nem sempre um evento de AS traz grandes consequências, ainda mais quando o evento ocorre em transcritos não envolvidos em processos essenciais e em processos regulatórios. Da mesma forma, pode se citar a grande quantidade de genes que se apresentam diferencialmente expressos sem apresentar eventos de AS, o que pode ser explicado pelos inúmeros outros meios de regulação gênica presentes em eucariotos, que podem estar agindo sob esses genes e os regulando sem a necessidade dos eventos de AS (IMAGAWA, 1996; PENALVA & ARST, 2002; BARTEL, 2004; HASHIMOTO *et al.*, 2009; ZHENG & SHABEK, 2017; ZHANG *et al.*, 2019).

A partir desses genes que apresentaram DAS e DE ao mesmo tempo e na mesma condição, foi realizada uma análise de enriquecimento funcional, que mostraram que genes envolvidos em vias conhecidamente importantes à adaptação, sobrevivência e

produção de fatores de virulência em *C. neoformans*, apresentando *splicing* alternativo e diferença de regulação de expressão, quando se compara condições de infecção inicial, tardia e condição de não-infecção.

As vias metabólicas da alanina, aspartato e glutamato aparece nos resultados com dois de seus genes (CNAG_00026 e CNAG_05389) apresentando *splicing* alternativo entre 6h e YPD e, interessantemente, estes mesmos genes aparecem regulados positivamente no início da infecção (6h), quando se compara com a condição controle. O gene CNAG_00026 possui dois transcritos anotados e codifica uma aminotransferase importantíssima que transforma ácido oxaloacético em ácido aspártico (*Enzyme commission* 2.6.1.1). Ao observar as *reads* deste gene no IGV, foi possível confirmar o padrão de Retenção de íntrons na condição YPD, o que não ocorre na condição 6h (Imagem não exposta no trabalho). Isso condiz com a sua anotação, de forma que o que se tem é uma diferença na expressão dos dois tipos de transcritos nas diferentes condições em que o fungo se encontra: na condição de infecção inicial, há maior expressão do primeiro transcrito, enquanto há maior expressão do segundo transcrito na condição YPD. Dessa forma, o que se infere é que, devido à estímulos provenientes da resposta às condições ambientais, a retenção de íntron presente na condição de não-infecção promove a produção de uma isoforma de expressão prejudicada, levando à uma regulação negativa deste gene na condição de não-infecção, enquanto a isoforma que não apresentou RI passa por seu processamento normal, ficando regulada positivamente na condição de infecção inicial, em comparação com a não-infecção. Relacionando com sua função na via, a regulação positiva e altas taxas de transcrição dessa aminotransferase levariam à maior ação na produção de aspartato e alfa-cetoglutarato. O primeiro composto é um aminoácido importante na biossíntese de purinas e pirimidinas, além de estar relacionado com a produção de outro aminoácido, a arginina, através do ciclo da ureia (STEVENS & LIPSCOMB, 1992; QUINTERO *et al.*, 2000). Além disso, o aspartato pode ser substrato para a gliconeogênese e, assim como o alfa-cetoglutarato, para o Ciclo de Krebs (TCA *cycle*), que se apresenta regulado positivamente nesta condição (FLORES *et al.*, 2000; HU *et al.*, 2008; LIEW *et al.*, 2016). Tais modulações, por sua vez, ocorrem com o objetivo de favorecer a produção de nucleotídeos – essenciais durante períodos em que a célula está se replicando, como em momentos iniciais de infecção (6h) (FREITAS *et al.*, 2022) –, bem como de favorecer a produção de energia

por vias alternativas, visto que o ambiente em que o fungo se encontra apresenta baixa concentração de glicose, em comparação com a condição de não-infecção, o que estimula a produção de energia por vias alternativas às 6 horas de infecção (KRONSTAD *et al.*, 2012). Ademais, o gene CNAG_02562 – presente na via de beta-alanina (via esta muito próxima da descrita anteriormente) e que também apresenta DAS e está *up* regulada na condição inicial de infecção – codifica uma desidrogenase (*Enzyme commission* 1.3.8.1) envolvida no metabolismo de Acetyl-CoA. Esta molécula, por sua vez, se apresenta como essencial na síntese de quitina (CANDY & KILBY, 1962; ALDEN *et al.*, 2022) – componente estrutural essencial da parede celular – e na O-acetilação da cápsula polissacarídica, através da acetiltransferase – sendo este processo muito importante para o fungo por permitir que a cápsula interfira no sistema imune do hospedeiro – mais especificamente, na migração de leucócitos, dentre outros mecanismos (KOZEL & GOTSCHLICH, 1982; ELLERBROEK *et al.*, 2004; HU *et al.*, 2008; PAULY & RAMIREZ, 2018).

Na comparação entre a infecção tardia e a condição e não-infecção (10d vs. YPD), tem-se como resultado a via de metabolismo de glicerofosfolipídeos como relevante, por apresentar 4 genes apresentando DAS nesta comparação, além destes estarem regulados positivamente na condição tardia de infecção. Tais genes são: CNAG_00936, CNAG_04408, CNAG_04869 e CNAG_05851, que codificam uma fosfolipase (*Enzyme commission* 3.1.1.4), uma quinase (CKI1) (*Enzyme commission* 2.7.1.32), uma esterase (PNB1) (*Enzyme commission* 3.1.1.7) e um transportador de glicerol, respectivamente. Glicerofosfolipídeos são compostos muito importantes no metaboloma, sendo os principais componentes de membrana celular, com função de manutenção da viabilidade celular. Por conterem em sua composição moléculas como lipídeos e grupos fosfato, estão envolvidos no metabolismo de diversas moléculas importantes à sobrevivência de *C. neoformans* no contexto da infecção (GHANOUM, 2000; MA & MAY, 2009; PAN *et al.*, 2018). A regulação positiva dessa via nessa condição se mostra muito interessante, uma vez que alguns de seus genes mencionados acima também fazem parte de outras vias relevantes, como o gene PNB1. Tal gene, interessantemente, também age na via de produção de inositol, produzindo 1 D myo-inositol, um metabólito intermediário na produção de Myo-inositol – molécula importante para a formação da cápsula polissacarídica (WANG *et al.*, 2021). Este gene, após ser analisado no IGV, foi confirmado como apresentando ES

na condição controle (Imagem não exposta no trabalho). Dessa forma, o uso alternativo de éxon diferencial apresentado por PNB1 na condição de não-infecção, quando se compara à condição de infecção tardia, pode estar auxiliando na sua maior expressão aos 10 dias de infecção, aumentando o metabolismo de inositol e a produção de cápsula, condizente com o que se observa em análises comportamentais do patógeno, como o observado por Freitas e colaboradores (2022), que identificaram uma regulação positiva de vias relacionadas ao inositol e produção de cápsula em tempos tardios de infecção, com o objetivo de garantir a sobrevivência no organismo do hospedeiro, principalmente pela sua importância na proteção do patógeno (DOERING, 2009; KOZEL & MASTROIANNI, 1976; FREITAS *et al.*, 2022).

Quando se analisam os genes que apresentam *splicing* alternativo e expressão diferenciais na comparação entre o momento inicial e infecção com o momento tardio, há a relevância do metabolismo iônico, pela ação do produto do gene CNAG_00979, o CTR4, que codifica um transportador de cobre envolvido na virulência de *C. neoformans* (WATERMAN *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2016). Nos resultados, este gene consta como apresentando *splicing* alternativo diferencial do tipo A3'SS. Contudo, infelizmente, a confirmação visual deste padrão não pode ser realizada, visto que os *reads* relativos ao tempo de 6h não puderam ser visualizados no IGV – isso se deve, provavelmente, à baixa quantidade de *reads* presentes nesta condição, uma vez que este gene se encontra mais expresso aos 10d que às 6h de infecção. Entretanto, com base em: (a) sua importante função para o patógeno, (b) seu perfil de expressão no contexto da infecção tardia e (c) sua anotação, que já evidencia que este gene passa por eventos de AS conhecidos, gerando 4 transcritos distintos, é hipotetizado que este gene passa pelo processo de A3'SS em momentos iniciais de infecção (6h) – processo este que ocorre quando o spliceossomo reconhece sítios alternativos 3' de *splicing* em um éxon – o que acarreta em expressão regulada negativamente nesse momento. Entretanto, para melhor elucidação destes mecanismos pelos quais o A3'SS causaria a regulação negativa neste momento só poderiam ser esclarecidos após novos experimentos, com outras metodologias e com enfoque na estrutura do mRNA final e como esta afeta a produção da proteína e, conseqüentemente, o proteoma do organismo.

No contexto da infecção inicial *versus* tardia, a maior expressão desse gene nos momentos tardios da criptococose está de acordo com o que se espera, visto que altos níveis de expressão de CTR4 são descritos após contato do fungo com células fagocitárias – contato este que ocorre mais tardiamente na infecção (WATERMAN *et al.*, 2007; FREITAS *et al.*, 2022). Ademais, este gene é amplamente associado com a produção de melanina, um relevante fator de virulência de *C. neoformans* que se mostra mais presente em momentos tardios de infecção e que protege o patógeno de espécies reativas de oxigênio (ROS) e outros tipos de estresse (KOZEL & MASTROIANNI, 1976), justamente pelo mecanismo de produção deste pigmento depender da ação da enzima lacase que, por sua vez, depende da presença do cobre – disponibilizado pela ação do CTR4 (ZHU & WILLIAMSON, 2004; WATERMAN *et al.* 2007). Em contraste, no início da infecção – momento em que hipotetiza-se aqui que haja uma regulação negativa do CTR4 através do *splicing* alternativo descrito acima – não é interessante para o patógeno que hajam altos níveis de expressão desse transportador de Cobre, uma vez que o ambiente pulmonar é rico nesse metal e, nesse momento inicial, o patógeno ainda não necessita de altos níveis de Cu⁺ (SUN *et al.*, 2014), por estar passando por outros processos que não aqueles que consomem muito desses íons, como os descritos acima (ZHU & WILLIAMSON, 2004; WATERMAN *et al.* 2007; FREITAS *et al.*, 2022). Consoante com tal afirmação, é sabido que, no ambiente pulmonar, a superexpressão de CTR4 influencia negativamente a virulência de *C. neoformans*, por causar a morte deste microrganismo através de intoxicação por Cu⁺, ao ponto que, nesta espécie, há um sofisticado mecanismo de detoxificação de cobre, que é essencial para a virulência deste (DING *et al.*, 2013; SUN *et al.*, 2014). Neste contexto, a expressão de CTR4 às 6h precisaria ser regulada de alguma maneira a fim de evitar tal intoxicação – regulação esta que pode estar sendo realizada pelo AS do tipo A3'SS descoberto nas análises deste trabalho.

7. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados por este trabalho demonstram a ocorrência de AS em *C. neoformans* durante a infecção, e identificam os perfis de *splicing* alternativo nos estágios de infecção inicial (6h) e tardia (10d), em comparação entre si e com a condição de não-infecção (YPD). O *splicing* alternativo diferencial – mecanismo importante de regulação pós-transcricional – se mostra muito expressivo na comparação entre as condições de infecção e a condição e não infecção, enquanto o perfil desses eventos já não é tão expressivo quando se compara dois tempos distintos de infecção. Tal resultado corrobora com as análises de transcriptoma já realizadas durante o desenvolvimento da criptococose e, outrossim, com a proposição de que estes eventos de *splicing* alternativo possuem um papel importante na regulação do fitness do fungo, em resposta à estímulos ambientais.

Apesar de alguns eventos ainda carecerem de elucidação e outras análises, este trabalho fornece informações relevantes quanto às diferenças de *splicing* presentes no patógeno oportunista *C. neoformans* entre condições de infecção e de não infecção, inclusive, identificando possíveis eventos de *splicing* alternativo ainda não anotados para, pelo menos, dois genes de *C. neoformans*.

8. PERSPECTIVAS

- ❖ Avaliar se existe influência do(s) padrão(ões) de AS identificados na estrutura e estabilidade do mRNA e das proteínas codificadas por estes genes.
- ❖ Confirmar, por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), os possíveis padrões de *splicing* alternativo ainda não anotados, principalmente para os genes CNAG_05734 e CNAG_02751.
- ❖ Validar se os genes que apresentaram DAS e que só tem um transcrito anotado, também apresentam um padrão de AS ainda não anotado.
- ❖ Realizar análises de *splicing* alternativo com o transcriptoma do camundongo, a fim de descobrir como se dá o perfil de *splicing* alternativo do hospedeiro e, assim, relacionar as respostas do patógeno e do hospedeiro, no contexto da infecção.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJELLO, L. Occurrence of *Cryptococcus neoformans* in soils. 1958. Apud KWON-CHUNG, Kyung J. et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, v. 4, a019760. Jul. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019760>. Acesso em: 04 jun. 2021.

AGUIAR, Paula A. D. F. *et al.* The epidemiology of cryptococcosis and the characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated in a Brazilian University Hospital. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 59, e13. Abr. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201759013>. Acesso em: 03 jun. 2021.

ALDEN, Katy M. et al. Genetic interaction analysis reveals that *Cryptococcus neoformans* utilizes multiple acetyl-CoA-generating pathways during infection. **Mbio**, v. 13, n. 4, p. e01279-22, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mbio.01279-22>. Acesso em: 06 abr. 2023.

ALTIBI, Ahmed *et al.* *Cryptococcus neoformans* automated implantable cardioverter-defibrillator (aicd) endocarditis: a challenging case of a rare fungal endocarditis. **J Am Coll Cardiol**. v. 75, p. 2973. Mar. 2020. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(20\)33600-7](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(20)33600-7). Acesso em: 18 mar. 2023.

ALVAREZ, Mauricio & CASADEVALL, Arturo. Phagosome extrusion and host-cell survival after *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages. **Curr Biol**, v. 16, p. 2161–2165. Nov. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.09.061>. Acesso em: 28 de nov. 2022.

AMIT, Maayan et al. Differential GC content between exons and introns establishes distinct strategies of splice-site recognition. **Cell Rep.**, v. 1, p. 543–556. Mai. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.03.013>. Acesso em: 05 set. 2021.

ANDERS, Simon, REYES, Alejandro, & HUBER, Wolfgang. Detecting differential usage of exons from RNA-seq data. **Genome research**, v. 22, p. 2008–2017. Out. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/gr.133744.111>. Acesso em: 13 ago. 2021.

ANDRADE-SILVA Leonardo E. *et al.* Genotypic analysis of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates from Brazil reveals the presence of VNB isolates and a correlation with biological factors. **PLoS ONE**, v. 13, e0193237. Mar. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193237>. Acesso em: 02 jun. 2021.

BAHN, Yong-Sun *et al.* unique fungal two-component system regulates stress responses, drug sensitivity, sexual development, and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Mol Biol Cell**, v. 17, p. 3122-3135. Jul. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-02-0113>. Acesso em: 03 out. 2021.

BAKER, Rosanna P. *et al.* *Cryptococcus neoformans* melanization incorporates multiple catecholamines to produce polytypic melanin. **Journal of Biological**

Chemistry, v. 298, 101519. Jan. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101519>. Acesso em: 04 fev. 2023.

BARTEL, David. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, v. 116, p. 281–297. Jan. 2004. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00045-5). Acesso em 20 mar. 2023.

BASSETTI, Matteo *et al.* Antifungal susceptibility testing in *Candida*, *Aspergillus* and *Cryptococcus* infections: are the MICs useful for clinicians?. **Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 26. p. 1024–1033. Ago. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.02.017>. Acesso em 05 de set. 2023.

BAUWENS, Luc *et al.* Isolation of *Cryptococcus neoformans* van *neoformans* in the Aviaries of the Antwerp Zoological Gardens. 1986. *Apud* SERNA-ESPINOSA, Briggith N., *et al.* Environmental Status of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Colombia. **Journal of fungi**, v. 7, p. 410. Maio 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jof7060410>. Acesso em: 15 jun. 2021.

BITENCOURT, Tamires A. *et al.* The *prp4* kinase gene and related spliceosome factor genes in *Trichophyton rubrum* respond to nutrients and antifungals. **Journal of medical microbiology**, v. 68, p. 591–599. Abr. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000967>. Acesso em: 16 set. 2021.

BLACK, Douglas L. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. **Annual review of biochemistry**, v. 72, p. 291–336. Fev. 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161720>. Acesso em: 07 set. 2021.

BLANC, Véronique *et al.* Postoperative *Cryptococcus neoformans* endocarditis. **Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 2, p. 66–69. Ago. 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.tb00205.x>. Acesso em: 18 mar. 2023.

BOGAERTS, J *et al.* AIDS-associated cryptococcal meningitis in Rwanda (1983-1992): epidemiologic and diagnostic features. **The Journal of infection**, v. 39, p. 32–37. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0163-4453\(99\)90099-3](https://doi.org/10.1016/s0163-4453(99)90099-3). Acesso em: 04 ago. 2021.

BROWN, Sarah M.; CAMPBELL, Leona T. & LODGE, Jennifer K. *Cryptococcus neoformans*, a fungus under stress. **Current opinion in microbiology**, v. 10, p. 320–325. Ago. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.05.014>. Acesso em: 16 jun. 2021.

CAZA, Mélissa, & KRONSTAD, James. The cAMP/Protein Kinase a Pathway Regulates Virulence and Adaptation to Host Conditions in *Cryptococcus neoformans*. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 9, 212. Jun 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00212>. Acesso em: 03 fev. 2023.

CALDAS, Hugo *et al.* Dissecting the role of endothelial SURVIVIN DeltaEx3 in angiogenesis. **Blood**, v. 109, p. 1479–1489. Fev. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-003749>. Acesso em: 18 set. 2021.

CANDY, D. J. & KILBY, B. A. Studies on chitin synthesis in the desert locust. **Journal of Experimental Biology**, v. 39, n. 1, p. 129-140, 1962. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/jeb.39.1.129>. Acesso em: 07 abr. 2023.

CANO, Edison *et al.* *Cryptococcus* Species Other Than *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: Are They Clinically Significant?. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 7, ofaa527. Dez 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa527>. Acesso em 27 de fev. 2022.

CARMONA, Eva M., & LIMPER, Andrew H. Overview of Treatment Approaches for Fungal Infections. **Clinics in chest medicine**, v. 38, p. 393–402. Set. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2017.04.003>. Acesso em: 27 ago. 2021.

CHANG, YC & KWON-CHUNG, Kyung J. Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. **Mol Cell Biol.**, v. 14, p. 4912-9. Jul. 1994. Disponível em: [10.1128/mcb.14.7.4912-4919.1994](https://doi.org/10.1128/mcb.14.7.4912-4919.1994). Acesso em: 04 jun. 2021.

CHARLIER, Caroline *et al.* Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain Invasion by *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 77, p. 120–127. Jan. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/IAI.01065-08>. Acesso em: 28 de nov. 2022.

CHEN, Ming-Jiu *et al.* Biochemical and cellular characteristics of the 3' -> 5' exonuclease TREX2. **Nucleic acids research**, v. 35, p. 2682–2694. Abr. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkm151>. Acesso em: 18 set. 2021.

CHEN, Sharon C. *et al.* Epidemiology and host- and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. Australasian Cryptococcal Study Group. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 31, p. 499–508. Ago. 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/313992>. Acesso em: 19 ago. 2021.

CHEN, Sharon C. *et al.* Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*: a new virulence factor?. **The Journal of infectious diseases**, v. 175, p. 414–420. Fev. 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/infdis/175.2.414>. Acesso em: 22 jun. 2021.

CHERNIAK, Robert; JONES, Ronald G., & REISS, Errol. Structure determination of *Cryptococcus neoformans* serotype A-variant glucuronoxylomannan by ¹³C-n.m.r. spectroscopy. **Carbohydrate research**, v. 172, p. 113–138. Jan 1988. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0008-6215\(00\)90846-2](https://doi.org/10.1016/s0008-6215(00)90846-2). Acesso em: 08 jun. 2021.

CHERNIAK, Robert; REISS, Errol & TURNER, Susan H. A GALACTOXYLOMANNAN ANTIGEN OF *Cryptococcus neoformans* SEROTYPE A. **Carbohydrate Research**, v. 103, p. 239-250. Maio 1982. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)80686-2](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)80686-2). Acesso em: 08 jun. 2021.

CHIAPELLO, Laura S. *et al.* Immunosuppression, interleukin-10 synthesis and apoptosis are induced in rats inoculated with *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan. **Immunology**, v. 113, p. 392–400. Set. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.01970.x>. Acesso em: 21 jun. 2021.

CHOW, Eve W. *et al.* Elucidation of the calcineurin-Crz1 stress response transcriptional network in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **PLoS Genet**, v. 13, e1006667. Abril 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006667>. Acesso em: 03 out. 2021.

COX, Gary M. *et al.* Superoxide dismutase influences the virulence of *Cryptococcus neoformans* by affecting growth within macrophages. **Infect Immun.**, v. 71, p. 173-180. Jan. 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/IAI.71.1.173-180.2003>. Acesso em: 04 out. 2021.

DING, Chen *et al.* *Cryptococcus neoformans* copper detoxification machinery is critical for fungal virulence. **Cell host & microbe**, v. 13, n. 3, p. 265-276, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.02.002>. Acesso em: 07 abr. 2023.

DOBIN, Alexander *et al.* STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. **Bioinformatics**, Oxford, England, V. 29, p. 15–21, Jan. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>. Acesso em: 11 set. 2021.

DOERING, Tamara L. How sweet it is! Cell wall biogenesis and polysaccharide capsule formation in *Cryptococcus neoformans*. **Annual review of microbiology**, v. 63, p. 223–247. Out. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162753>. Acesso em: 08 jun. 2021.

DONG, Zao M., & MURPHY, Juneann W. Mobility of human neutrophils in response to *Cryptococcus neoformans* cells, culture filtrate antigen, and individual components of the antigen. **Infection and immunity**, v. 61, p. 5067–5077. Dez. 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/iai.61.12.5067-5077.1993>. Acesso em: 18 jun. 2021.

D'SOUZA, Cletus *et al.* Genome variation in *Cryptococcus gattii*, an emerging pathogen of immunocompetent hosts. **mBio**, v. 2, e00342–10. Fev. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mBio.00342-10>. Acesso em: 11 jul. 2021.

EARLY, Philip. *et al.* Two mRNAs can be produced from a single immunoglobulin mu gene by alternative RNA processing pathways. **Cell**, v. 20, p. 313–319. Jun 1980. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(80\)90617-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(80)90617-0). Acesso em: 27 jun. 2021.

ELLERBROEK, Pauline M. *et al.* Cryptococcal glucuronoxylomannan inhibits adhesion of neutrophils to stimulated endothelium in vitro by affecting both neutrophils and endothelial cells. **Infection and immunity**, v. 70, p. 4762–4771. Set. 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/IAI.70.9.4762-4771.2002>. Acesso em: 21 jun. 2021.

ELLERBROEK, Pauline M. *et al.* O-acetylation of cryptococcal capsular glucuronoxylomannan is essential for interference with neutrophil migration. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 12, p. 7513-7520, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.12.7513>. Acesso em: 11 abr. 2023.

EMMONS, Chester. W. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil. **Journal of bacteriology**, v. 62, p. 685–690. Jul 1951. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jb.62.6.685-690.1951>. Acesso em: 11 jun. 2021.

ERGIN, Çagri *et al.* *Cryptococcus neoformans* Recovered From Olive Trees (*Olea europaea*) in Turkey Reveal Allopatry With African and South American Lineages. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 9, p. 384. Nov. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00384>. Acesso em: 10 jun. 2021.

FAN, Weihua *et al.* *Cryptococcus neoformans* gene expression during murine macrophage infection. **Eukaryot Cell**, v. 4, p. 1420–1433. Ago. 2005. Disponível em: [10.1128/EC.4.8.1420-1433.2005](https://doi.org/10.1128/EC.4.8.1420-1433.2005). Acesso em 23 mar. 2023.

FARRER, Ryss *et al.* A new lineage of *Cryptococcus gattii* (VGV) discovered in the Central Zambesian Miombo Woodlands. **mBio** v. 10, e02306-19. Nov. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mBio.02306-19>. Acesso em: 23 fev. 2023.

FELDMESSER, Marta., *et al.* *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. **Infection and immunity**, v. 68, p. 4225–4237. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/IAI.68.7.4225-4237.2000>. Acesso em 03 de fev. 2023.

FIRACATIVE, Carolina; MEYER, Wieland & CASTAÑEDA, Elizabeth. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* Species Complexes in Latin America: A Map of Molecular Types, Genotypic Diversity, and Antifungal Susceptibility as Reported by the Latin American Cryptococcal Study Group. **Journal of Fungi**, v. 7, 282. Mar 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jof7040282>. Acesso em: 07 jun. 2021.

FLORES, C. L. Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. **FEMS microbiology reviews**, v. 24, p. 507–529. Out. 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00553.x>. Acesso em 27 mar. 2023.

FOUNTAIN, John *et al.* *Cryptococcus neoformans* infective endocarditis after lung transplantation: a case report and review of the literature. **Infectious diseases in clinical practice (Baltimore, Md.)**, v. 29, p. 457–461. Nov. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/ipc.0000000000001030>. Acesso em: 18 de mar. 2023

FRANCISCO, Elaine C.; DE JONG Auke W.; HAGEN, F. Cryptococcosis and *Cryptococcus*. **Mycopathologia**, v. 186, p. 729–731. Out. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11046-021-00577-7>. Acesso em: 26 de fev. 2023.

FRANZOT, Sarah P.; SALKIN, Ira F.; & CASADEVALL, Arturo. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. **Journal of clinical microbiology**, v. 37, p. 838–840. Mar 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JCM.37.3.838-840.1999>. Acesso em: 07 jun. 2021.

FREIRE, Ana Karla *et al.* Molecular characterisation of the causative agents of Cryptococcosis in patients of a tertiary healthcare facility in the state of Amazonas-Brazil. **Mycoses**, v. 55, p. 145–150. Fev. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2012.02173.x>. Acesso em: 05 jun. 2021.

FREITAS, Gustavo et al. The Dynamics of *Cryptococcus neoformans* Cell and Transcriptional Remodeling during Infection. *Cells*, v. 11, 3896. Dez. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells11233896>. Acesso em: 10 fev. 2023.

FU, Man S. et al. *Cryptococcus neoformans* urease affects the outcome of intracellular pathogenesis by modulating phagolysosomal pH. **PLoS pathogens**, v. 14, e1007144. Jun. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007144>. Acesso em: 22 jun. 2021.

GAGO, Sara et al. Molecular identification, antifungal resistance and virulence of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus deneoformans* isolated in Seville, Spain. **Mycoses**, v. 60, p. 40–50. Jan 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/myc.12543>. Acesso em: 7 de dez. 2021.

GERIK, Kimberly J. et al. PKC1 is essential for protection against both oxidative and nitrosative stresses, cell integrity, and normal manifestation of virulence factors in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic cell**, v. 7, p. 1685–1698. Out. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/EC.00146-08>. Acesso em: 16 jun. 2021.

GHANEM, Hebah & SIVASUBRAMANIAN, Geetha. *Cryptococcus neoformans* Meningoencephalitis in an Immunocompetent Patient after COVID-19 Infection. **Case reports in infectious diseases**, Article ID 5597473. Jun 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2021/5597473>. Acesso em 16 de jan. 2022.

GILBERT, Walter. Why genes in pieces? **Nature**, v. 271, p. 501-501. Fev. 1978. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/271501a0>. Acesso em: 06 set. 2021.

GOEBELS, Carolin et al. Introns Regulate Gene Expression in *Cryptococcus neoformans* in a Pab2p Dependent Pathway. **Plos Genet.** v. 9, e1003686. Ago. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003686>. Acesso em: 19 jun. 2021.

GONZALEZ-HILARION, Sara et al. Intron retention-dependent gene regulation in *Cryptococcus neoformans*. **Scientific Reports**, v. 6, 32252. Ago. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep32252> . Acesso em: 18 jun. 2021.

GRÜTZMANN, Konrad et al. Fungal alternative splicing is associated with multicellular complexity and virulence: a genome-wide multi-species study. **DNA research: an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes**, v. 21, p. 27–39. Fev. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/dnares/dst038>. Acesso em: 22 ago. 2021.

HAGEN, Ferry et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii/Cryptococcus neoformans* species complex. **Fungal genetics and biology**, v. 78, p. 16–48. Maio 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.02.009>. Acesso em: 03 jun. 2021.

HASHIMOTO, Koshi et al. A liver X receptor (LXR)-beta alternative splicing variant (LXRBSV) acts as an RNA co-activator of LXR-beta. **Biochemical and biophysical**

research communications, v. 390, p. 1260–1265. Out. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.10.132>. Acesso em: 17 set. 2021.

HEITMAN, Joseph *et al.* The *Cryptococcus neoformans* genome sequencing project. **Mycopathologia**, v. 148, p. 1–7. Out. 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/a:1007136602930>. Acesso em: 05 jun. 2021.

HERRING, Amy *et al.* Induction of interleukin-12 and gamma interferon requires tumor necrosis factor alpha for protective T1-cell-mediated immunity to pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. **Infection and immunity**, v. 70, p. 2959–2964. Jun 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/IAI.70.6.2959-2964.2002>. Acesso em 07 jan. 2023.

HOFACKER, Ivo L. *et al.* Fast folding and comparison of RNA secondary structures. **Monatsh Chem**, v. 125, p. 167–188. Fev. 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00818163>. Acesso em: 19 set. 2021.

HU, Guanggan *et al.* Metabolic adaptation in *Cryptococcus neoformans* during early murine pulmonary infection. *Molecular microbiology*, v. 69, p. 1456–1475. Set. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06374.x>. Acesso em: 10 fev. 2023.

HUFFNAGLE, Gary *et al.* Street, The role of CD4+ and CD8+ T cells in the protective inflammatory response to a pulmonary cryptococcal infection. **Journal of leukocyte biology**, v. 55, p. 35–42. Jan. 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jlb.55.1.35>. Acesso em 07 jan. 2023.

IBRAHIM, Heba, *et al.* Genome-wide alternative splicing profiling in the fungal plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* during the colonization of diverse host families. **Molecular plant pathology**, v. 22, p. 31–47. Jan. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/mp.13006>. Acesso em: 10 nov. 2021.

ILLUMINA. Quality Scores for Next-Generation Sequencing. 2011. Disponível em: https://www.illumina.com/Documents/products/technotes/technote_Q-Scores.pdf. Acesso em 07 abr. 2023.

IMAGAWA, Masayoshi. Negative regulation of gene expression in eukaryotes. *Neurochemistry international*, v. 29, p. 565–572. Dez. 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0197-0186\(96\)00058-7](https://doi.org/10.1016/s0197-0186(96)00058-7). Acesso em 22 mar. 2023.

IRIMIA, Manuel *et al.* A highly conserved program of neuronal microexons is misregulated in autistic brains. **Cell**, v. 159, p. 1511–1523. Dez. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.035>. Acesso em: 11 ago. 2021.

JANBON, Guilhem *et al.* Analysis of the genome and transcriptome of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* reveals complex RNA expression and microevolution leading to virulence attenuation. **Plos Genet**, v. 10, 1004261. Abr. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004261>. Acesso em: 10 jul. 2021.

JANBON, Guilhem. Introns in *Cryptococcus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 113:e170519. Disponível em: [10.1590/0074-02760170519](https://doi.org/10.1590/0074-02760170519). Acesso em 21 mar. 2023.

JIANG, Nan *et al.* Identification and functional demonstration of miRNAs in the fungus *Cryptococcus neoformans*. **PLoS One**, v. 7:e52734. Out. 2015. Disponível em: [10.1371/journal.pone.0052734](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052734). Acesso em 21 mar. 2023.

KALSOTRA, Auinash & COOPER, Thomas A. Functional consequences of developmentally regulated alternative splicing. **Nature reviews. Genetics**, v. 12, p. 715–729. Set. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrg3052>. Acesso em: 21 ago. 2021.

KELEMEN, Olga *et al.* Function of alternative splicing. **Gene**, v. 514, p. 1–30. Fev. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.07.083>. Acesso em: 17 set. 2021.

KHAN, Zafar U. *et al.* Carriage of *Cryptococcus neoformans* in the crops of pigeons. **Journal of medical microbiology**, v. 11, p. 215–218. Maio 1978. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/00222615-11-2-215>. Acesso em: 09 jun. 2021.

KHATIB, Mohamad Y. *et al.* Cryptococemia in a patient with COVID-19: A case report. **Clinical Case Reports**, v. 9, p. 853-855. Dez. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ccr3.3668>. Acesso em 29 de jan. 2022.

KIM, Eddo; MAGEN, Alon & AST, Gil. Different levels of alternative splicing among eukaryotes. **Nucleic acids research**, v. 35, p. 125–131. Jan. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkl924>. Acesso em: 21 set. 2021.

KIM, Kwang S. Microbial translocation of the blood-brain barrier. **International journal for parasitology**, v. 36, p. 607–614. Maio 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.01.013>. Acesso em: 10 ago. 2021.

KOZEL, Thomas R. & GOTSCHLICH, E. C. The capsule of *Cryptococcus neoformans* passively inhibits phagocytosis of the yeast by macrophages. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 129, n. 4, p. 1675-1680, 1982. Acesso em: 13 abr. 2023.

KOZEL, Thomas R., & MASTROIANNI, Robert P. Inhibition of phagocytosis by cryptococcal polysaccharide: dissociation of the attachment and ingestion phases of phagocytosis. **Infection and immunity**, v. 14, p. 62–67. Jul 1976. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/iai.14.1.62-67.1976>. Acesso em: 08 jun. 2021.

KOZUBOWSKI, Lukasz; LEE, Soo C. & HEITMAN, Joseph. Signalling pathways in the pathogenesis of *Cryptococcus*. **Cellular microbiology**, v. 11, p. 370–380. Fev. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01273.x>. Acesso em: 15 jun. 2021.

KRAKAUER, *et al.* Proinflammatory cytokines: TNF, and IL-1 families, chemokines, TGF- β , and others, p. 775-811. 1999. *apud* ROHATGI, Soma & PIROFSKI, Liise. Host immunity to *Cryptococcus neoformans*. **Future Microbiol.**, v. 10, p. 565-581. Fev. 2016. Disponível em: [10.2217/fmb.14.132](https://doi.org/10.2217/fmb.14.132). Acesso em 07 jan. 2023.

KRONSTAD, Jim *et al.* Adaptation of *Cryptococcus neoformans* to mammalian hosts: integrated regulation of metabolism and virulence. **Eukaryot Cell**. v. 11, p. 109-18. Fev. 2012. Disponível em: [10.1128/EC.05273-11](https://doi.org/10.1128/EC.05273-11). Acesso em 23 mar. 2023.

KUCHAK AFSHARI, Agha *et al.* Epidemiology and molecular characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated from pigeon excreta in Mazandaran province, northern Iran. **Journal de mycologie medicale**, v. 22, p. 160–166. Jun. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2012.02.002>. Acesso em: 13 jun. 2021.

KUPFER, Doris *et al.* Introns and splicing elements of five diverse fungi. **Eukaryot Cell**, v. 3, p. 1088–1100. Out. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/EC.3.5.1088-1100.2004>. Acesso em: 12 jul. 2021.

KWON-CHUNG, Kyung J. *et al.* *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 4, a019760. Jul. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019760>. Acesso em: 04 jun. 2021.

KWON-CHUNG, Kyung J. *et al.* Melanin-lacking mutants of *Cryptococcus neoformans* and their virulence for mice. **Journal of bacteriology**, v. 150, p. 1414–1421. Jun. 1982. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jb.150.3.1414-1421.1982>. Acesso em: 17 jun. 2021.

KWON-CHUNG, Kyung J. *et al.* The Case for Adopting the "Species Complex" Nomenclature for the Etiologic Agents of Cryptococcosis. **mSphere**, v. 2, e00357-16. Fev. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mSphere.00357-16>. Acesso em: 04 jun. 2021.

KWON-CHUNG, Kyung J. Morphogenesis of *Filobasidiella Neoformans*, the Sexual State of *Cryptococcus Neoformans*. **Mycologia**, v. 68:4, p. 821-833. Mar. 1976. Disponível em: [10.1080/00275514.1976.12019959](https://doi.org/10.1080/00275514.1976.12019959). Acesso em: 08 jun. 2021.

KWON-CHUNG, Kyung J. *et al.* (1557) Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. honduricus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). **Taxon**, v. 51, p. 804-806. Nov. 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.2307/1555045>. Acesso em: 03 jun. 2021.

LE, Kai-Qin. *et al.* Alternative splicing as a biomarker and potential target for drug discovery. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 36, p. 1212–1218. Jun. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/aps.2015.43>. Acesso em: 07 set. 2021.

LEAL, Juliana *et al.* A splice variant of the *Neurospora crassa* hex-1 transcript, which encodes the major protein of the Woronin body, is modulated by extracellular phosphate and pH changes. **FEBS letters**, v. 583, p. 180–184. Jan. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.11.050>. Acesso em: 17 set. 2021.

LEE, Soo C. *et al.* Pseudohyphal growth of *Cryptococcus neoformans* is a reversible dimorphic transition in response to ammonium that requires Amt1 and Amt2 ammonium permeases. **Eukaryotic cell**, v. 11, p. 1391–1398. Nov. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/EC.00242-12>. Acesso em: 02 out. 2021.

LI, Hailong *et al.* Unveil the transcriptional landscape at the *Cryptococcus*-host axis in mice and nonhuman primates. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, e0007566.

Jul. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007566>. Acesso em: 10 nov. 2021.

LI, Yimin *et al.* Cryptococcal endocarditis of native valves without immunodeficiency or drug abuse: a case report. **The Journal of international medical research**, v. 48, 300060520970763. Dez 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0300060520970763>. Acesso em: 18 mar. 2023.

LIEW, Kah *et al.* In Vitro Analysis of Metabolites Secreted during Infection of Lung Epithelial Cells by *Cryptococcus neoformans*. **PLoS One**. v. 11:e0153356. Abr. 2016. Disponível em: [10.1371/journal.pone.0153356](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153356). Acesso em 23 mar. 2023.

LIN, Xiaorong; HULL, Christina & HEITMAN, Joseph. Sexual reproduction between partners of the same mating type in *Cryptococcus neoformans*. **Nature**, v. 434, p. 1017–1021. Abr. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature03448>. Acesso em: 08 jun. 2021.

LIU, Tong-Bao; PERLIN, David S.; & XUE, Chaoyang. (2012). Molecular mechanisms of cryptococcal meningitis. **Virulence**, v. 3, p. 173–181. Mar-Abr. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/viru.18685>. Acesso em: 06 ago. 2021.

LITTMAN, Michael. Cryptococcosis (Torulosis): Current concepts and therapy. *The American Journal of Medicine*, v. 27, p. 976–988. Dez 1959. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(59\)90181-0](https://doi.org/10.1016/0002-9343(59)90181-0). Acesso em 10 jan. 2023.

LOFTUS, Brendan J. *et al.* The Genome of the Basidiomycetous Yeast and Human Pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Science**, New York, v. 307, p. 1321–1324. Fev. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1103773>. Acesso em: 11 jul. 2021.

LÓPEZ, Marcela D.; ROSENBLAD, Magnus A. & SAMUELSSON, Tore. Computational screen for spliceosomal RNA genes aids in defining the phylogenetic distribution of major and minor spliceosomal components. **Nucleic Acids Research**, v. 36, p. 3001–3010. Maio 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkn142>. Acesso em: 21 set. 2021.

LOVE, Michael; HUBER, Wolfgang & ANDERS, Simon. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biol**, v. 15, 550. Dez. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>. Acesso em: 25 fev. 2023.

LYNCH, Kristen W. Regulation of alternative splicing by signal transduction pathways. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 623, p. 161–174. Jan. 2007. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-0-387-77374-2_10. Acesso em: 16 set. 2021.

MA, Hansong & MAY, Robin. Virulence in *Cryptococcus* species. *Adv Appl Microbiol.*, v. 67, p. 131-90. 2009. Disponível em: [10.1016/S0065-2164\(08\)01005-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)01005-8). Acesso em 01 abr. 2023.

MANCINI, Estefania *et al.* ASpli: integrative analysis of splicing landscapes through RNA-Seq assays, **Bioinformatics**, v. 37, p. 2609–2616, Set. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btab141>. Acesso em: 10 set. 2021.

MAZIARZ, Eileen K., & PERFECT, John R. Cryptococcosis. **Infectious disease clinics of North America**, v. 30, p. 179–206. Mar. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.006>. Acesso em: 14 jun. 2021.

MCGUIRE, Colin; WALTER, Dylan & WOPPERER, Samuel. *Cryptococcus neoformans* endocarditis in an immunocompetent patient a case report. **BMC Cardiovasc Disorders**, v. 22, 565. Dez. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12872-022-02997-9>. Acesso em: 18 de mar. 2023

MENDES, Niede S. *et al.* Pre-mRNA splicing is modulated by antifungal drugs in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. **FEBS open bio**, v. 6, p. 358–368. Abr. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12047>. Acesso em: 17 set. 2021.

MESA-ARANGO, Ana Cecilia *et al.* The production of reactive oxygen species is a universal action mechanism of Amphotericin B against pathogenic yeasts and contributes to the fungicidal effect of this drug. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, p. 6627–6638. Nov. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.03570-14>. Acesso em: 27 ago. 2021.

MOMIN, Mahek & WEBB, Ginny. The Environmental Effects on Virulence Factors and the Antifungal Susceptibility of *Cryptococcus neoformans*. *Int. J. Mol. Sci.*, 22, 6302. Jun. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms22126302>. Acesso em 23 mar. 2023.

MUZAFAR, Suraya *et al.* Intron distribution and emerging role of alternative splicing in fungi. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 26;368(19):fnab135. Out. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/femsle/fnab135>. Acesso em 27 mar. 2023.

NEVES-DA-ROCHA, João *et al.* Alternative Splicing in Heat Shock Protein Transcripts as a Mechanism of Cell Adaptation in *Trichophyton rubrum*. **Cells**, v. 8, 1206. Out. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells8101206>. Acesso em: 17 set. 2021.

NGAMSKULRUNGROJ, Popchai *et al.* The primary target organ of *Cryptococcus gattii* is different from that of *Cryptococcus neoformans* in a murine model. **mBio**, v. 3, e00103-12. Maio 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mBio.00103-12>. Acesso em: 27 ago. 2021.

NOSANCHUK, Joshua D., & CASADEVALL, Arturo. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, p. 3519–3528. Nov. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.00545-06>. Acesso em: 17 jun. 2021.

PAN, Jiao *et al.* Lipid Biosynthesis as an Antifungal Target. *J Fungi (Basel)*. V. 20;4(2):50. Abr. 2018. Disponível em: [10.3390/jof4020050](https://doi.org/10.3390/jof4020050). Acesso em 27 mar. 2023.

PARK, Benjamin J. *et al.* Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **AIDS**, v. 23, p. 525–530. Fev. 2009.

Disponível em: <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e328322ffac>. Acesso em: 03 ago. 2021.

PAULY, Markus; RAMÍREZ, Vicente. New insights into wall polysaccharide O-acetylation. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 1210, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01210>. Acesso em: 11 abr. 2023.

PEÑALVA, Miguel & ARST, Herbert. Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 66, p. 426–446. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.426-446.2002>. Acesso em 22 mar. 2023.

PERFECT, John *et al.* Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis**, v. 50, p. 291–322. Fev. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/649858>. Acesso em 05 de set. 2020.

PFALLER, Michael *et al.* Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus fumigatus*: application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiologic cutoff values to characterize resistance in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2009). **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 69, p. 45-50. Jan 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.08.013>. Acesso em 10 de set. 2020.

PFALLER, Michael *et al.* In vitro activities of voriconazole, posaconazole, and fluconazole against 4,169 clinical isolates of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* collected during 2001 and 2002 in the ARTEMIS global antifungal surveillance program. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 48, p. 201–205. Mar 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2003.09.008>. Acesso em 12 de out. 2020.

PROUDFOOT, Nick. Ending the message: poly(A) signals then and now. *Genes & development*, v. 25, p. 1770–1782. Set 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/gad.17268411>. Acesso em 24 mar. 2023.

QUINTERO, María José *et al.* Arginine catabolism in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 involves the urea cycle and arginase pathway. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 4, p. 1008-1015, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JB.182.4.1008-1015.2000>. Acesso em: 15 abr. 2023.

RAJASINGHAM, Radha *et al.* Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 17, p. 873–881. Ago. 2017. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30243-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30243-8). Acesso em: 05 ago. 2021.

RANDHAWA, Harbans S.; KOWSHIK, T & KHAN, Zafar U. Efficacy of swabbing versus a conventional technique for isolation of *Cryptococcus neoformans* from decayed wood in tree trunk hollows, **Medical Mycology**, v. 43, p. 67–71. Fev. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/13693780410001712025>. Acesso em: 09 jun. 2021.

ROBINSON, James T. *et al.* Integrative genomics viewer. **Nature biotechnology**, v. 29, p. 24–26. Jan. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nbt.1754>. Acesso em: 19 set. 2021.

RUDE, Thomas *et al.* Relationship of the glyoxylate pathway to the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Infection and immunity*, v. 70, p. 5684–5694. Out. 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/IAI.70.10.5684-5694.2002>. Acesso em: 10 fev. 2023.

SABIITI, Wilber & MAY, Robin C. Mechanisms of infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Future microbiology**, v. 7, p. 1297–1313. Nov. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.2217/fmb.12.102>. Acesso em: 09 ago. 2021.

SACHS, A. The role of poly(A) in the translation and stability of mRNA. *Curr Opin Cell Biol* v. 2, p. 1092-1098. Dez 1990. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(90\)90161-7](https://doi.org/10.1016/0955-0674(90)90161-7). Acesso em 24 mar. 2023.

SCHREIBER, Konrad *et al.* Alternative Splicing in Next Generation Sequencing Data of *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS one**, v. 10, e0140487. Out. 2015 Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140487>. Acesso em: 17 ago. 2021.

SCRIVEN, James *et al.* The CSF Immune Response in HIV-1-Associated Cryptococcal Meningitis: Macrophage Activation, Correlates of Disease Severity, and Effect of Antiretroviral Therapy. **Journal of acquired immune deficiency syndromes**, v. 75, p. 299–307. Jul. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/QAI.000000000000138>. Acesso em 06 jan. 2023.

SEELBINDER, Bastian, *et al.* Triple RNA-Seq Reveals Synergy in a Human Virus-Fungus Co-infection Model. **Cell reports**, v. 33, 108389. Nov. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108389>. Acesso em: 10 nov. 2021.

SETIANINGRUM, Findra *et al.* Pulmonary cryptococcosis: A review of pathobiology and clinical aspects. **Medical Mycology**, v. 57, p. 133-150. Fev. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/mmy/myy086>. Acesso em: 02 jun. 2021.

SHARMA, Smita *et al.* COVID-19- associated Pulmonary Cryptococcosis: A Rare Case Presentation. *Indian J Crit Care Med*, v. 26, p. 129–132. Jan. 2022. Disponível em: [10.5005/jp-journals-10071-24084](https://doi.org/10.5005/jp-journals-10071-24084). Acesso em 16 de jan. 2023.

SHEN, Shihao. *et al.* rMATS: Robust and Flexible Detection of Differential Alternative Splicing from Replicate RNA-Seq Data. **PNAS**, v. 111, p. 5593-5601. Dez. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1419161111>. Acesso em: 20 jun. 2020.

SHIN, Chanseok & MANLEY, James. Cell signalling and the control of pre-mRNA splicing. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 5, p. 727–738. Set. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrm1467>. Acesso em: 16 set. 2021.

SIEBER, Patricia *et al.* Comparative study on alternative splicing in human fungal pathogens suggests its involvement during host invasion. **Front Microbiol**, v. 9, 2313. Out. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02313>. Acesso em: 09 jul. 2021.

SLOAN, Derek J. & PARRIS, Victoria. Cryptococcal meningitis: epidemiology and therapeutic options. **Clinical epidemiology**, v. 6, p. 169–182. Maio 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/CLEP.S38850>. Acesso em: 24 ago. 2021.

SMITH, Lloyd M.; KELLEHER, Neil L. & Consortium for Top Down Proteomics. Proteoform: a single term describing protein complexity. **Nature methods**, v. 10, p. 186–187. Mar. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nmeth.2369>. Acesso em: 06 set. 2021.

SPECHT, Charles *et al.* Contribution of glycosylation to T cell responses stimulated by recombinant *Cryptococcus neoformans* mannoprotein, *The Journal of infectious diseases*. v. 196, p. 796–800. Set. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/520536>. Acesso em 06 jan. 2023.

STAJICH, Jason; DIETRICH, Fred & ROY, Scott. Comparative genomic analysis of fungal genomes reveals intron-rich ancestors. **Genome Biol**, v. 8, R223. Out. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-10-r223>. Acesso em: 11 jul. 2021.

STEEN *et al.* *Cryptococcus neoformans* gene expression during experimental cryptococcal meningitis. *Eukaryotic cell*, v. 2, p. 1336–1349. Dez. 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/EC.2.6.1336-1349.2003>. Acesso em: 10 fev. 2023.

STEENBERGEN, Judith N.; SHUMAN, Howard A., & CASADEVALL, Arturo. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, p. 15245–15250. Dez. 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.261418798>. Acesso em: 10 jun. 2021.

STEVENS, Raymond C.; LIPSCOMB, William N. A molecular mechanism for pyrimidine and purine nucleotide control of aspartate transcarbamoylase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 12, p. 5281-5285, 1992. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC49275/>. Acesso em: 15 abr. 2023.

STRICKLAND, Ashley & SHI, Meiging. Mechanisms of fungal dissemination. **Cell. Mol. Life Sci**, v. 78, p. 3219-3238. Abr. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03736-z>. Acesso em: 14 de ago. 2022.

SUN, Tian-Shu *et al.* Reciprocal functions of *Cryptococcus neoformans* copper homeostasis machinery during pulmonary infection and meningoencephalitis. **Nature communications**, v. 5, n. 1, p. 5550, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ncomms6550>. Acesso em: 06 abr. 2023.

SWINNE-DESGAIN, Danielle. *Cryptococcus neoformans* of saprophytic origin, 1975 *Apud* KWON-CHUNG, Kyung J. *et al.* *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 4, a019760. Jul. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019760>. Acesso em: 04 jun. 2021.

TAN, Savannah; NASR, George & HARDING, Cameron. Lung Masses as a Presenting Sign of Disseminated Cryptococcus. **Cureus**, v. 13, e15185. Maio 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.7759/cureus.15185>. Acesso em: 18 de mar. 2023.

THE EUROPEAN NUCLEOTIDE ARCHIVE (ENA). EMBL-EBI, c2021. Página inicial. Disponível em: <https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/home>. Acesso em: 10 jul. 2021.

THYAGARAJAN, Rama; MONDY, Kristin; Mondy; ROSE, Dusten. *Cryptococcus neoformans* blood stream infection in severe COVID-19 pneumonia. **IDCases**, v. 26, e01274, ISSN 2214-2509. Ago. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2021.e01274>. Acesso em: 7 de jan. 2023.

TUCKER, Stephanie & CASADEVALL, Arturo. Replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, p. 3165–3170. Mar. 2002. Disponível em: Acesso em: 28 de nov. 2022.

UEZU, Kaori *et al.* Accumulation of T Cells in the lungs and their regulatory roles in Th1 response and host defense against pulmonary infection with cryptococcus neoformans, **Journal of immunology** (Baltimore, Md.: 1950), v. 172, p. 7629–7634. Jun 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.12.7629>. Acesso em 07 jan. 2023.

ULE, Jernej, & BLENCOWE, Benjamin J. Alternative Splicing Regulatory Networks: Functions, Mechanisms, and Evolution. **Molecular cell**, v. 76, p. 329–345. Out. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.09.017>. Acesso em: 20 jun. 2021.

UPADHYA, Rajendra *et al.* *Cryptococcus neoformans* Cda1 and Cda2 coordinate deacetylation of chitin during infection to control fungal virulence. **The Cell Surface**, v. 7, 100066. Out. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tcs.2021.100066>. Acesso em: 7 de dez. 2021.

WAGER, Chrissy *et al.* Cryptococcus and Phagocytes: Complex Interactions that Influence Disease Outcome. **Front Microbiol.**, v. 7:105. Fev. 2016. doi: 10.3389/fmicb.2016.00105. Acesso em 10 jan. 2023.

WANG, Bin *et al.* Survey of the transcriptome of *Aspergillus oryzae* via massively parallel mRNA sequencing. **Nucleic Acids Res**, v.38, p. 5075–5087. Ago. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkq256>. Acesso em: 20 ago. 2021.

WANG, Yina, et al. Inositol Metabolism Regulates Capsule Structure and Virulence in the Human Pathogen *Cryptococcus neoformans*. **mBio**, v. 12, e0279021. Dez. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mBio.02790-21>. Acesso em: 10 fev. 2023.

WATERMAN, Scott et al Role of a CUF1/CTR4 copper regulatory axis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, p. 794–802. Mar. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI30006>. Acesso em: 10 fev. 2023.

WATERHOUSE, Andrew *et al.* SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic acids research**, v. 46, p. 296–303. Jul. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>. Acesso em: 19 set. 2021.

WHO Fungal Priority Pathogens List To Guide Research, Development And Public Health Action. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Acesso em: 25 mar. 2023.

WIRTH, Fernanda; AZEVEDO, Maria Isabel; & GOLDANI, Luciano Z. Molecular types of *Cryptococcus* species isolated from patients with cryptococcal meningitis in a Brazilian tertiary care hospital. **The Brazilian journal of infectious diseases**, v. 22, p. 495–498. Dez. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2018.11.002>. Acesso em: 07 jun. 2021.

WRIGHT, Lesley C. *et al.* Cryptococcal lipid metabolism: phospholipase B1 is implicated in transcellular metabolism of macrophage-derived lipids. **Eukaryotic cell**, v. 6, p. 37–47. Jan. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/EC.00262-06>. Acesso em: 22 jun. 2021.

XIE, Bin-Bin *et al.* Deep RNA sequencing reveals a high frequency of alternative splicing events in the fungus *Trichoderma longibrachiatum*. **BMC genomics**, v. 16, p. 1–15. Fev. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1251-8>. Acesso em: 15 ago. 2021.

YU, Chen-Hsin *et al.* Gene Expression of Diverse *Cryptococcus* Isolates during Infection of the Human Central Nervous System. **mBio**. v. 12:e0231321. Nov. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mBio.02313-21>. Acesso em: 02 abr. 2023.

ZARAGOZA, Oscar. Basic principles of the virulence of *Cryptococcus*. **Virulence**, v. 10, p. 490-501. Maio 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1614383>. Acesso em: 17 jun. 2021.

ZARAGOZA, Oscar *et al.* Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. **Cellular microbiology**, v. 10, p. 2043–2057. Set. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01186.x>. Acesso em: 18 jun. 2021.

ZARAGOZA, Oscar *et al.* Fungal cell gigantism during mammalian infection. **PLoS pathogens**, v. 6, e1000945. Jun. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000945>. Acesso em: 23 jun. 2021.

ZHANG, Ping, et al. Effects of CTR4 deletion on virulence and stress response in *Cryptococcus neoformans*. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 109, p. 1081–1090. Ago. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10482-016-0709-2>. Acesso em 01 abr. 2023.

ZHANG, Peijing et al. Non-Coding RNAs and their Integrated Networks. *J Integr Bioinform*, v. 16:20190027. Jul. 2019. Disponível em: [10.1515/jib-2019-0027](https://doi.org/10.1515/jib-2019-0027). Acesso em 20 mar. 2023.

ZHAO, Youbao & LIN, Xiaorong. *Cryptococcus neoformans*: Sex, morphogenesis, and virulence. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 89, p. 1567-1348. Abr. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104731>. Acesso em: 28 de nov. 2022.

ZHENG, Ning, & SHABEK, Nitzan. Ubiquitin Ligases: Structure, Function, and Regulation. **Annual review of biochemistry**, v. 86, p. 129–157. Jun 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014922>. Acesso em 22 mar. 2023.

ZHU, Xudong, & WILLIAMSON, Peter. Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *FEMS yeast research*, v. 5, p. 1–10. Out. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.04.004>. Acesso em 03 abr. 2023.

ANEXO 1: TABELAS COM TODOS OS GENES RESULTANTES DAS ANÁLISES DE USO DIFERENCIAL DE ÉXONS (DEU) PARA *Cryptococcus neoformans*

Tabela S1: Localização genômica, anotação e número de exons e transcritos dos genes de *C. neoformans* que apresentaram DEU na comparação 6h vs. YPD, de acordo com o banco de dados FungiDB.

Gene ID	Cromossomo	Número de éxons	Descrição	Número de transcritos
CNAG_09010	MT	3	NADH dehydrogenase subunit 2	1
CNAG_09011	MT	3	NADH dehydrogenase subunit 3	1
CNAG_02800	3	2	hypothetical protein	1
CNAG_12256	3	2	unspecified product	1
CNAG_05064	4	2	hypothetical protein	1
CNAG_02364	6	2	hypothetical protein	1
CNAG_09002	MT	2	apocytochrome b	1
CNAG_03933	2	3	Transmembrane protein	1
CNAG_06706	2	3	proline-, glutamic acid- and leucine-rich protein 1	1

CNAG_06717	2	3	Acyl-CoA-dependent ceramide synthase	1
CNAG_01093	5	3	hypothetical protein	1
CNAG_07716	8	3	hypothetical protein	1
CNAG_07746	8	3	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP)	1
CNAG_01895	11	3	hypothetical protein	1
CNAG_09000	MT	3	NADH dehydrogenase subunit 1	1
CNAG_00262	1	5	hypothetical protein, variant	2
CNAG_02979	3	4	hypothetical protein	1
CNAG_06917	3	4	thiol-specific antioxidant protein 3	1
CNAG_01194	5	3	hypothetical protein	1
CNAG_07775	9	4	hypothetical protein	1
CNAG_04762	10	4	large subunit ribosomal protein L4e	1
CNAG_06402	13	4	26S proteasome complex subunit DSS1	1
CNAG_06924	3	4	beta-fructofuranosidase	1

CNAG_00094	1	5	NAD-dependent epimerase/dehydratase	1
CNAG_00330	1	3	transcription factor TFIIB component b''	1
CNAG_00847	1	5	hypothetical protein	1
CNAG_02928	3	5	large subunit ribosomal protein L5e	1
CNAG_07564	3	5	hypothetical protein	1
CNAG_05179	4	5	ubiquinol-cytochrome c reductase core subunit 2	1
CNAG_02034	6	5	hypothetical protein	1
CNAG_02502	6	5	ATP-dependent RNA helicase DBP3	1
CNAG_05827	7	5	methionine-tRNA ligase, beta subunit	1
CNAG_06683	7	5	hypothetical protein	1
CNAG_03510	8	4	large subunit ribosomal protein L36e	1
CNAG_04215	9	5	sulfate adenylyltransferase	1
CNAG_01562	11	2	pr4/barwin domain protein	2
CNAG_01947	11	5	2,4-dienoyl-CoA reductase	1

CNAG_07904	12	5	hypothetical protein	1
CNAG_07954	1	3	hypothetical protein	3
CNAG_03849	2	6	nuclear protein	1
CNAG_04069	2	4	U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein PRP31	1
CNAG_02664	3	6	D-lactate dehydrogenase	1
CNAG_00873	5	5	hypothetical protein	1
CNAG_01019	5	6	superoxide dismutase [Cu-Zn]	1
CNAG_01272	5	6	hypothetical protein	1
CNAG_02038	6	6	hypothetical protein	1
CNAG_02115	6	5	Non-histone chromosomal protein 6, putative	1
CNAG_02293	6	7	hypothetical protein	2
CNAG_02332	6	6	hypothetical protein	1
CNAG_05741	7	7	hypothetical protein	2
CNAG_03125	8	6	hypothetical protein	1

CNAG_03198	8	5	small subunit ribosomal protein S8e	1
CNAG_03217	8	5	hypothetical protein	1
CNAG_04488	9	6	3-ketoacyl-CoA reductase	1
CNAG_06447	13	6	Large subunit ribosomal protein L17, putative	1
CNAG_05334	14	6	hypothetical protein	2
CNAG_00051	1	6	putative set3c deacetylase complex subunit	2
CNAG_00560	1	7	V-type H ⁺ -transporting ATPase subunit E	1
CNAG_00734	1	6	dihydroorotase, homodimeric type	2
CNAG_03712	2	7	hypothetical protein	1
CNAG_05161	4	7	hypothetical protein, variant	2
CNAG_00930	5	5	Argininosuccinate synthase	1
CNAG_01345	5	5	small subunit ribosomal protein S2	1
CNAG_02143	6	9	hypothetical protein	2
CNAG_05684	7	7	hypothetical protein	1

CNAG_05872	7	7	endopeptidase	1
CNAG_03144	8	7	peptide-methionine (S)-S-oxide reductase	1
CNAG_04163	9	7	hypothetical protein	1
CNAG_06100	12	7	hypothetical protein	1
CNAG_05466	14	4	hypothetical protein	1
CNAG_05469	14	7	E3 ubiquitin-protein ligase synoviolin	1
CNAG_05546	14	7	hypothetical protein	1
CNAG_00407	1	8	glyoxal oxidase	1
CNAG_07364	1	8	WD-repeat protein 21A	1
CNAG_00897	5	8	putative glucosidase	1
CNAG_00992	5	8	homocitrate synthase, mitochondrial	1
CNAG_02205	6	7	pH-response regulator protein palC, variant	2
CNAG_02458	6	8	GTPase activating protein	1
CNAG_05698	7	3	hypothetical protein	1

CNAG_04640	10	7	ATP-citrate synthase subunit 1	1
CNAG_01900	11	8	hypothetical protein	1
CNAG_06125	12	7	elongation factor 1-alpha	1
CNAG_00372	1	5	chromatin structure-remodeling complex protein RSC7	1
CNAG_04012	2	9	hypothetical protein	1
CNAG_06725	2	8	DNA polymerase delta subunit 2	1
CNAG_02853	3	9	amidophosphoribosyltransferase	1
CNAG_00979	5	5	Copper uptake transporter	4
CNAG_01318	5	9	sodium/hydrogen exchanger 3	1
CNAG_00593	1	7	hypothetical protein	2
CNAG_01165	5	10	D-erythro-sphingosine kinase	1
CNAG_01180	5	10	hypothetical protein	1
CNAG_01360	5	10	pumilio domain-containing protein c	1
CNAG_04172	9	11	transcription factor C subunit 6	1

CNAG_06295	13	7	cytoplasmic protein	2
CNAG_00757	1	12	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 8	1
CNAG_05393	14	12	ATPase	1
CNAG_00702	1	13	hypothetical protein	1
CNAG_06840	5	13	elongation factor 2	2
CNAG_03258	8	11	AGC protein kinase, variant 2	3
CNAG_06541	7	12	hypothetical protein, variant	2
CNAG_02548	6	12	cobalamin synthesis protein	2
CNAG_03713	2	16	efflux protein EncT, variant	2
CNAG_01668	11	16	hypothetical protein	1
CNAG_06117	12	18	hypothetical protein	3
CNAG_07766	9	16	DNA polymerase lambda subunit	1
CNAG_05748	7	20	NuA3 HAT complex component NTO1	2
CNAG_04724	10	20	ubiquitin-protein ligase E3 C	1

CNAG_02233	6	22	serine/threonine-protein kinase ATR	1
CNAG_04450	9	21	chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1	1

Gene em negrito: apresentou DEU nas três comparações.

Tabela S2: Localização genômica, anotação e número de exons e transcritos dos genes de *C. neoformans* que apresentaram DEU na comparação 6h vs. 10d, de acordo com o banco de dados FungiDB.

Gene ID	Cromossomo	Número de éxons	Descrição	Número de transcritos
CNAG_00402	1	6	translation initiation factor 4G	1
CNAG_00788	1	9	NADH dehydrogenase	1
CNAG_03626	2	9	actin cross-linking protein	1
CNAG_06717	2	3	Acyl-CoA-dependent ceramide synthase	1
CNAG_06725	2	8	DNA polymerase delta subunit 2	1
CNAG_02796	3	11	3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase	1
CNAG_02845	3	10	hypothetical protein	1

CNAG_12260	3	2	unspecified product	1
CNAG_07813	4	3	hypothetical protein	1
CNAG_00930	5	5	Argininosuccinate synthase	1
CNAG_01239	5	6	Chitin deacetylase	1
CNAG_02368	6	12	hypothetical protein, variant	2
CNAG_02458	6	8	GTPase activating protein	1
CNAG_07855	10	15	midasin	1
CNAG_01999	11	2	hypothetical protein	1
CNAG_05995	12	11	hypothetical protein	1
CNAG_06102	12	7	ADP,ATP carrier protein, variant 3	4
CNAG_06419	13	5	hypothetical protein	1
CNAG_09000	MT	3	NADH dehydrogenase subunit 1	1

Gene em negrito: apresentou DEU nas três comparações.

Tabela S3: Localização genômica, anotação e número de exons e transcritos dos genes de *C. neoformans* que apresentaram DEU na comparação 10d vs. YPD, de acordo com o banco de dados FungiDB.

Gene ID	Cromossomo	Número de exons	Descrição	Número de transcritos
CNAG_09010	MT	3	NADH dehydrogenase subunit 2	1
CNAG_09011	MT	3	NADH dehydrogenase subunit 3	1
CNAG_05064	4	2	hypothetical protein	1
CNAG_02364	6	2	hypothetical protein	1
CNAG_12847	9	2	unspecified product	1
CNAG_13121	13	2	unspecified product	1
CNAG_09002	MT	2	apocytochrome b	1
CNAG_00118	1	3	hypothetical protein	1
CNAG_06706	2	3	proline-, glutamic acid- and leucine-rich protein 1	1
CNAG_06717	2	3	Acyl-CoA-dependent ceramide synthase	1
CNAG_06612	7	3	hypothetical protein	1

CNAG_04289	9	3	hypothetical protein	1
CNAG_04703	10	3	DNA clamp loader	1
CNAG_06347	13	3	pr4/barwin domain protein	1
CNAG_13110	13	3	unspecified product	1
CNAG_00655	1	4	large subunit acidic ribosomal protein P1	1
CNAG_01194	5	3	hypothetical protein	1
CNAG_01353	5	4	hypothetical protein	1
CNAG_03408	8	4	hypothetical protein	1
CNAG_00094	1	5	NAD-dependent epimerase/dehydratase	1
CNAG_02164	6	5	hypothetical protein	1
CNAG_02210	6	5	ribonuclease Z	1
CNAG_06683	7	5	hypothetical protein	1
CNAG_01636	11	5	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like 1	1
CNAG_01947	11	5	2,4-dienoyl-CoA reductase	1

CNAG_01999	11	2	hypothetical protein	1
CNAG_07604	11	4	metalloreductase	1
CNAG_13067	12	5	unspecified product	1
CNAG_00603	1	6	pre-rRNA-processing protein PNO1	1
CNAG_00698	1	6	hypothetical protein	1
CNAG_06881	3	6	SBDS family rRNA metabolism protein	1
CNAG_02115	6	5	Non-histone chromosomal protein 6, putative	1
CNAG_02293	6	7	hypothetical protein	2
CNAG_05719	7	6	hypothetical protein	1
CNAG_03217	8	5	hypothetical protein	1
CNAG_03402	8	6	hypothetical protein	1
CNAG_04408	9	6	choline kinase	1
CNAG_06164	12	6	hypothetical protein	1
CNAG_06419	13	5	hypothetical protein	1

CNAG_05334	14	6	hypothetical protein	2
CNAG_00402	1	6	translation initiation factor 4G	1
CNAG_00930	5	5	Argininosuccinate synthase	1
CNAG_06650	7	6	hypothetical protein	2
CNAG_03379	8	6	N-acetyltransferase 5	1
CNAG_04530	9	7	DNA-binding protein	1
CNAG_07856	10	7	Arylsulfotransferase, putative	1
CNAG_01732	11	7	nuclear protein localization protein 4	1
CNAG_01979	11	5	transcription initiation factor TFIID subunit 10	1
CNAG_00407	1	8	glyoxal oxidase	1
CNAG_02981	3	7	paired amphipathic helix protein Sin3a	1
CNAG_07572	3	8	elongator complex protein 3	1
CNAG_01239	5	6	Chitin deacetylase	1
CNAG_01263	5	8	vacuolar transporter chaperone 4	1

CNAG_02129	6	7	hypothetical protein	1
CNAG_02458	6	8	GTPase activating protein	1
CNAG_06557	7	8	membrane protein	1
CNAG_03090	8	8	hypothetical protein	1
CNAG_06125	12	7	elongation factor 1-alpha	1
CNAG_00788	1	9	NADH dehydrogenase	1
CNAG_03626	2	9	actin cross-linking protein	1
CNAG_06725	2	8	DNA polymerase delta subunit 2	1
CNAG_00979	5	5	Copper uptake transporter	4
CNAG_01318	5	9	sodium/hydrogen exchanger 3	1
CNAG_05970	7	9	ste/ste20/paka protein kinase	1
CNAG_04210	9	9	MFS transporter, SP family, general alpha glucoside:H symporter	1
CNAG_04316	9	8	NAD kinase	1
CNAG_01719	11	7	hypothetical protein	1

CNAG_06032	12	10	ADP-ribosylation factor-like 2	2
CNAG_03734	2	9	hypothetical protein, variant 2	3
CNAG_02845	3	10	hypothetical protein	1
CNAG_01360	5	10	pumilio domain-containing protein c	1
CNAG_02368	6	12	hypothetical protein, variant	2
CNAG_06550	7	10	nucleoporin family protein	1
CNAG_04362	9	10	ATP-dependent RNA helicase DBP5	1
CNAG_00699	1	9	transmembrane receptor	1
CNAG_02677	3	11	cytoplasmic protein	1
CNAG_02796	3	11	3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase	1
CNAG_02180	6	10	phosphate transporter	1
CNAG_04191	9	11	SCYL protein kinase	1
CNAG_05995	12	11	hypothetical protein	1
CNAG_06102	12	7	ADP,ATP carrier protein, variant 3	4

CNAG_03414	8	11	hypothetical protein, variant	2
CNAG_01796	11	8	hypothetical protein	4
CNAG_05393	14	12	ATPase	1
CNAG_00633	1	13	hypothetical protein	1
CNAG_06832	5	9	glucosidase	3
CNAG_03258	8	11	AGC protein kinase, variant 2	3
CNAG_06541	7	2	hypothetical protein, variant	2
CNAG_06092	12	3	cyclin	1
CNAG_07739	8	16	hypothetical protein	1
CNAG_07855	10	15	midasin	1
CNAG_01835	11	23	hypothetical protein	1
CNAG_03355	8	43	Two-component-like sensor kinase	1

Gene em negrito: apresentou DEU nas três comparações.

ANEXO 2: TABELAS COM TODOS OS GENES RESULTANTES DAS ANÁLISES DE *SPLICING* ALTERNATIVO DIFERENCIAL PARA *Cryptococcus neoformans*

Tabela S4: Localização genômica, tipo de AS, anotação e número de exons e transcritos dos genes de *C. neoformans* que apresentaram DAS na comparação 6h vs. YPD, de acordo com o banco de dados FungiDB.

rMATS			FungiDB		
GeneID	Cromossomo	Tipo de AS	Descrição	Número de éxons no gene	Número de transcritos anotados
CNAG_00030	chr1	A3'SS	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	7	2
CNAG_00031	chr1	A3'SS	hypothetical protein	13	2
CNAG_00422	chr1	A3'SS	hypothetical protein	13	2
CNAG_00522	chr1	A3'SS	C2 domain-containing protein	9	2
CNAG_00681	chr1	A3'SS	condensin complex subunit 3	15	2
CNAG_00687	chr1	A3'SS	hypothetical protein	10	2
CNAG_00732	chr1	A3'SS	hypothetical protein	9	3
CNAG_00736	chr1	A3'SS	exocyst protein	16	2

CNAG_00889	chr5	A3'SS	hypothetical protein	5	2
CNAG_00906	chr5	A3'SS	nucleolar pre-ribosomal-associated protein 1	16	2
CNAG_00936	chr5	A3'SS	lipid particle protein	12	2
CNAG_00937	chr5	A3'SS	hypothetical protein	9	3
CNAG_00979	chr5	A3'SS	Copper uptake transporter	9	4
CNAG_00995	chr5	A3'SS	hypothetical protein	8	2
CNAG_01004	chr5	A3'SS	hypothetical protein	8	3
CNAG_01030	chr5	A3'SS	hypothetical protein	3	2
CNAG_01059	chr5	A3'SS	vacuolar membrane protein	8	2
CNAG_01191*	chr5	A3'SS	long-chain fatty acid transporter	8	3
CNAG_01235	chr5	A3'SS	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB2	8	2
CNAG_01278	chr5	A3'SS	Aminophospholipid translocase, putative	16	2
CNAG_01303	chr5	A3'SS	hypothetical protein	3	2
CNAG_01314	chr5	A3'SS	vacuolar protein	23	2

CNAG_01336	chr5	A3'SS	hypothetical protein	21	2
CNAG_01376	chr5	A3'SS	stress response protein NST1	6	2
CNAG_01512	chr11	A3'SS	hypothetical protein	9	2
CNAG_01573	chr11	A3'SS	hypothetical protein	13	2
CNAG_01608	chr11	A3'SS	nuclear GTP-binding protein	9	2
CNAG_01642	chr11	A3'SS	DNA mismatch repair protein MSH3	30	2
CNAG_01827*	chr11	A3'SS	hypothetical protein	23	4
CNAG_01952	chr11	A3'SS	aryl-alcohol dehydrogenase	16	2
CNAG_02143	chr6	A3'SS	hypothetical protein	7	2
CNAG_02203	chr6	A3'SS	karyopherin/importin that interacts with the nuclear pore complex	18	2
CNAG_02224	chr6	A3'SS	hypothetical protein	6	2
CNAG_02302	chr6	A3'SS	hypothetical protein	6	2
CNAG_02318	chr6	A3'SS	hypothetical protein	9	2
CNAG_02324	chr6	A3'SS	hypothetical protein	10	2

CNAG_02387	chr6	A3'SS	hypothetical protein	8	2
CNAG_02420	chr6	A3'SS	hypothetical protein	5	2
CNAG_02427	chr6	A3'SS	hypothetical protein	9	2
CNAG_02476	chr6	A3'SS	putative transcription factor	22	2
CNAG_02510*	chr6	A3'SS	hypothetical protein	8	3
CNAG_02528	chr6	A3'SS	hypothetical protein	4	2
CNAG_02579	chr3	A3'SS	ARID-containing regulator of virulence traits and carbon assimilation	8	2
CNAG_02810	chr3	A3'SS	pumilio-family RNA binding protein	10	2
CNAG_02818	chr3	A3'SS	Glycine cleavage system T protein	7	2
CNAG_02859	chr3	A3'SS	NADH kinase	14	4
CNAG_02941	chr3	A3'SS	hypothetical protein	13	2
CNAG_02953	chr3	A3'SS	tuberin	10	2
CNAG_03016	chr3	A3'SS	chaperone regulator	8	2
CNAG_03024	chr3	A3'SS	AGC protein kinase	12	2

CNAG_03032	chr3	A3'SS	dynactin 2	6	2
CNAG_03043	chr3	A3'SS	hypothetical protein	7	3
CNAG_03086	chr8	A3'SS	hypothetical protein	8	2
CNAG_03120	chr8	A3'SS	alpha-1,3-glucan synthase	15	2
CNAG_03239	chr8	A3'SS	hypothetical protein	7	2
CNAG_03314	chr8	A3'SS	YTH domain family 2	8	2
CNAG_03404	chr8	A3'SS	hypothetical protein	7	2
CNAG_03461	chr8	A3'SS	hypothetical protein	10	2
CNAG_03545	chr8	A3'SS	hypothetical protein	6	3
CNAG_03645	chr2	A3'SS	NET1-associated nuclear protein 1 (U3 small nucleolar RNA-associated protein 17)	8	2
CNAG_03756	chr2	A3'SS	hypothetical protein	16	2
CNAG_03775	chr2	A3'SS	hypothetical protein	10	3
CNAG_03830	chr2	A3'SS	hypothetical protein	12	3
CNAG_03839	chr2	A3'SS	CCR4-NOT transcription complex subunit 4	12	3

CNAG_03953	chr2	A3'SS	Sua5/YciO/YrdC/YwIC family protein	3	2
CNAG_04143	chr9	A3'SS	hypothetical protein	8	2
CNAG_04224	chr9	A3'SS	carboxy-terminal domain RNA polymerase II polypeptide A small phosphatase	7	2
CNAG_04339	chr9	A3'SS	exocyst complex component exo84	10	2
CNAG_04404	chr9	A3'SS	hypothetical protein	18	2
CNAG_04465	chr9	A3'SS	small nuclear ribonucleoprotein	7	2
CNAG_04545	chr9	A3'SS	CTD kinase subunit gamma	7	2
CNAG_04786	chr10	A3'SS	hypothetical protein	5	2
CNAG_04848	chr10	A3'SS	mRNA binding protein	11	2
CNAG_05161	chr4	A3'SS	hypothetical protein	7	2
CNAG_05238	chr4	A3'SS	hypothetical protein	5	2
CNAG_05304	chr4	A3'SS	hypothetical protein	14	3
CNAG_05313	chr4	A3'SS	hypothetical protein	25	5
CNAG_05406	chr14	A3'SS	cell cycle arrest protein BUB2	9	2

CNAG_05413	chr14	A3'SS	phosphatidylinositol glycan, class Q	14	2
CNAG_05479	chr14	A3'SS	Fungal specific transcription factor, putative	21	2
CNAG_05673	chr7	A3'SS	GPI inositol-deacylase	10	2
CNAG_05747	chr7	A3'SS	vacuolar protein sorting-associated protein VTA1	10	3
CNAG_05771	chr7	A3'SS	serine/threonine-protein kinase TEL1	12	2
CNAG_05882	chr7	A3'SS	class E vacuolar protein-sorting machinery protein HSE1	13	2
CNAG_05928	chr7	A3'SS	hypothetical protein	4	2
CNAG_06109	chr12	A3'SS	hypothetical protein	6	2
CNAG_06310	chr13	A3'SS	CAMK/CAMKL protein kinase	12	3
CNAG_06450	chr13	A3'SS	hypothetical protein	9	2
CNAG_06524	chr7	A3'SS	hypothetical protein	14	2
CNAG_06531	chr7	A3'SS	hypothetical protein	11	2
CNAG_06622	chr7	A3'SS	hypothetical protein	7	2
CNAG_06697	chr7	A3'SS	TTK protein kinase	11	2

CNAG_06727	chr2	A3'SS	hypothetical protein	12	3
CNAG_06831	chr5	A3'SS	hypothetical protein	6	2
CNAG_06862	chr5	A3'SS	vacuolar protein	8	3
CNAG_06978	chr8	A3'SS	cytoplasmic protein	6	2
CNAG_07015	chr5	A3'SS	hypothetical protein	9	2
CNAG_07332	chr1	A3'SS	hypothetical protein	11	2
CNAG_07419	chr5	A3'SS	hypothetical protein	4	2
CNAG_07434	chr5	A3'SS	HAD hydrolase, family IIID	11	2
CNAG_07573	chr3	A3'SS	DNA ligase 4	31	2
CNAG_07682	chr7	A3'SS	hypothetical protein	16	2
CNAG_07755	chr9	A3'SS	hypothetical protein	7	3
CNAG_07830	chr4	A3'SS	hypothetical protein	12	2
CNAG_07845*	chr10	A3'SS	hypothetical protein	4	3
CNAG_07881	chr14	A3'SS	hypothetical protein	8	3

CNAG_07940	chr13	A3'SS	hypothetical protein	4	2
CNAG_07950*	chr1	A3'SS	hypothetical protein	7	3
CNAG_07989	chr7	A3'SS	Velvet-like factor, putative	11	2
CNAG_01152	chr5	A5'SS	small subunit ribosomal protein S6e	6	2
CNAG_01570	chr11	A5'SS	hypothetical protein	17	2
CNAG_01739	chr11	A5'SS	hypothetical protein	9	2
CNAG_02105	chr6	A5'SS	methylated-DNA-protein-cysteine methyltransferase	5	2
CNAG_02484	chr6	A5'SS	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	6	2
CNAG_02552	chr6	A5'SS	transketolase	14	3
CNAG_04028	chr2	A5'SS	RNA binding protein	11	2
CNAG_05304	chr4	A5'SS	hypothetical protein	14	3
CNAG_06065	chr12	A5'SS	inositol polyphosphate-5-phosphatase F	11	2
CNAG_06161	chr12	A5'SS	hypothetical protein	13	2
CNAG_05146	chr4	MXE	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB9	5	1

CNAG_00024*	chr1	RI	hypothetical protein	8	3
CNAG_00026	chr1	RI	kynurenine aminotransferase	9	2
CNAG_00303*	chr1	RI	high-affinity nicotinic acid transporter	19	2
CNAG_00305	chr1	RI	chaperone activator	9	2
CNAG_00732	chr1	RI	hypothetical protein	9	3
CNAG_00834	chr1	RI	Phosphatidylserine decarboxylase	7	2
CNAG_00877	chr5	RI	Adenylate kinase	11	2
CNAG_00998	chr5	RI	hypothetical protein	8	2
CNAG_01004*	chr5	RI	hypothetical protein	8	3
CNAG_01055	chr5	RI	phospholipid transporter	19	2
CNAG_01244	chr5	RI	hypothetical protein	7	2
CNAG_01295	chr5	RI	acyl carrier protein	7	2
CNAG_01297*	chr5	RI	hypothetical protein	18	3
CNAG_01299	chr5	RI	hypothetical protein	12	2

CNAG_01334	chr5	RI	hypothetical protein	9	2
CNAG_01490	chr11	RI	hypothetical protein	4	2
CNAG_01675	chr11	RI	tagatose-bisphosphate aldolase	10	2
CNAG_01690	chr11	RI	MFS transporter	24	3
CNAG_01696	chr11	RI	chaperone DnaJ	7	2
CNAG_01753	chr11	RI	hypothetical protein	7	2
CNAG_01827	chr11	RI	hypothetical protein	23	4
CNAG_02012	chr11	RI	TPR repeat-containing protein	4	2
CNAG_02174	chr6	RI	signal recognition particle protein SRP54	13	3
CNAG_02388	chr6	RI	hypothetical protein	5	2
CNAG_02438	chr6	RI	hypothetical protein	9	2
CNAG_02476	chr6	RI	putative transcription factor	22	2
CNAG_02516	chr6	RI	hypothetical protein	7	3
CNAG_02552*	chr6	RI	transketolase	14	3

CNAG_02705*	chr3	RI	hypothetical protein	9	3
CNAG_02806	chr3	RI	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 1	8	2
CNAG_02996*	chr3	RI	flavoprotein oxygenase	17	3
CNAG_03036	chr3	RI	potassium ion transporter	16	2
CNAG_03037	chr3	RI	hypothetical protein	10	2
CNAG_03163	chr8	RI	hypothetical protein	11	3
CNAG_03181	chr8	RI	hypothetical protein	4	2
CNAG_03234	chr8	RI	cell wall surface anchor protein	4	2
CNAG_03247	chr8	RI	sterol 3beta-glucosyltransferase	17	2
CNAG_03313	chr8	RI	hypothetical protein	4	2
CNAG_03414	chr8	RI	hypothetical protein	12	2
CNAG_03543	chr8	RI	hypothetical protein	7	2
CNAG_03771	chr2	RI	DNA binding protein Ncp1	8	2
CNAG_03793	chr2	RI	hypothetical protein	5	2

CNAG_03830	chr2	RI	hypothetical protein	12	3
CNAG_03883	chr2	RI	hypothetical protein	4	2
CNAG_03912	chr2	RI	Putative major facilitator superfamily (MFS) transporter	9	2
CNAG_03914	chr2	RI	hypothetical protein	12	2
CNAG_04226	chr9	RI	U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein 1	7	2
CNAG_04380	chr9	RI	peptidase	6	2
CNAG_04468	chr9	RI	Tartrate dehydrogenase	8	2
CNAG_04618	chr10	RI	hypothetical protein	9	2
CNAG_04759	chr10	RI	hypothetical protein	8	2
CNAG_04868	chr10	RI	cytoplasmic protein	8	2
CNAG_05156	chr4	RI	hypothetical protein	9	2
CNAG_05161	chr4	RI	hypothetical protein	7	2
CNAG_05266	chr4	RI	membrane protein	5	2
CNAG_05308	chr4	RI	beta-catenin-like protein 1	6	2

CNAG_05510	chr14	RI	hypothetical protein	6	2
CNAG_05529	chr14	RI	hypothetical protein	5	2
CNAG_05734	chr7	RI	cell wall organization and biogenesis-related protein, putative	10	2
CNAG_05748	chr7	RI	NuA3 HAT complex component NTO1	18	2
CNAG_06124	chr12	RI	hypothetical protein	4	2
CNAG_06159	chr12	RI	hypothetical protein	5	2
CNAG_06184	chr12	RI	hypothetical protein	10	2
CNAG_06290	chr13	RI	Low-affinity glucose transporter HXT2	18	2
CNAG_06395	chr13	RI	hypothetical protein	5	2
CNAG_06463	chr13	RI	hypothetical protein	4	2
CNAG_06588	chr7	RI	hypothetical protein	9	2
CNAG_06650	chr7	RI	hypothetical protein	7	2
CNAG_06784	chr2	RI	hypothetical protein	7	2
CNAG_06818	chr5	RI	Putative Zn(II)2Cys6 transcription factor	12	3

CNAG_06864	chr5	RI	hypothetical protein	4	2
CNAG_07011	chr12	RI	hypothetical protein	21	2
CNAG_07344	chr1	RI	ras guanyl-nucleotide exchange factor	17	2
CNAG_07466	chr2	RI	U3 small nucleolar RNA-associated protein 7	8	3
CNAG_07505	chr3	RI	hypothetical protein	8	2
CNAG_07520	chr3	RI	endopeptidase	17	3
CNAG_07537	chr3	RI	mitochondrial GTPase 1	7	2
CNAG_07730	chr8	RI	tricarboxylate transporter	7	2
CNAG_07954	chr1	RI	hypothetical protein	6	3
CNAG_00016	chr1	SE	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm5	4	1
CNAG_00020	chr1	SE	hypothetical protein	11	1
CNAG_00036*	chr1	SE	SEC14 cytosolic factor	8	1
CNAG_00046	chr1	SE	26S proteasome regulatory subunit N8	6	1
CNAG_00057*	chr1	SE	fructose-1,6-bisphosphatase I	5	1

CNAG_00065	chr1	SE	ran-binding protein 1	7	1
CNAG_00085	chr1	SE	histone chaperone ASF1	6	1
CNAG_00088	chr1	SE	prohibitin PHB1	9	1
CNAG_00130	chr1	SE	CAMK/CAMK1/CAMK1-RCK protein kinase	10	1
CNAG_00139	chr1	SE	hypothetical protein	8	1
CNAG_00235	chr1	SE	amt family ammonium transporter	12	1
CNAG_00251	chr1	SE	hypothetical protein	6	1
CNAG_00258	chr1	SE	Fungal gamma tubulin complex family protein	10	1
CNAG_00276	chr1	SE	hypothetical protein	6	1
CNAG_00303	chr1	SE	high-affinity nicotinic acid transporter	19	2
CNAG_00383	chr1	SE	Aminophospholipid translocase, putative	25	1
CNAG_00398	chr1	SE	hypothetical protein	5	1
CNAG_00418	chr1	SE	S-adenosylmethionine synthase	5	1
CNAG_00498	chr1	SE	cell division cycle protein 14	8	1

CNAG_00507	chr1	SE	nitrilase	8	1
CNAG_00517	chr1	SE	hypothetical protein	6	1
CNAG_00522	chr1	SE	C2 domain-containing protein	9	2
CNAG_00584	chr1	SE	Profilin	6	1
CNAG_00587	chr1	SE	hypothetical protein	4	1
CNAG_00597	chr1	SE	amino acid transporter	10	2
CNAG_00645	chr1	SE	2,5-diamino-6-(ribosylamino)-4(3H)-pyrimidinone 5'-phosphate reductase	5	1
CNAG_00710	chr1	SE	Glutamine synthetase	13	1
CNAG_00716	chr1	SE	Cytochrome c	7	1
CNAG_00722	chr1	SE	large subunit ribosomal protein L27	3	1
CNAG_00792	chr1	SE	ATP-binding cassette transporter	34	1
CNAG_00806	chr1	SE	hypothetical protein	4	1
CNAG_00819	chr1	SE	small subunit ribosomal protein S30	4	1
CNAG_00821	chr1	SE	large subunit ribosomal protein L34e	5	1

CNAG_00848	chr1	SE	hypothetical protein	13	3
CNAG_00866	chr5	SE	transketolase	16	2
CNAG_00867	chr5	SE	myo-inositol transporter, putative	12	3
CNAG_00877	chr5	SE	Adenylate kinase	11	2
CNAG_00886	chr5	SE	Adenosylhomocysteinase	7	1
CNAG_00909	chr5	SE	phosphopantothencysteine decarboxylase	6	1
CNAG_00936	chr5	SE	lipid particle protein	12	2
CNAG_00970	chr5	SE	phosphatidate cytidyltransferase	12	1
CNAG_00984	chr5	SE	glucose and ribitol dehydrogenase	7	1
CNAG_00990	chr5	SE	F-type H ⁻ -transporting ATPase subunit H	6	2
CNAG_01025	chr5	SE	hypothetical protein	6	1
CNAG_01048	chr5	SE	hypothetical protein	15	2
CNAG_01102	chr5	SE	oxidoreductase	5	1
CNAG_01137	chr5	SE	aconitate hydratase, mitochondrial	8	1

CNAG_01150	chr5	SE	omega-6 fatty acid desaturase (delta-12 desaturase)	6	1
CNAG_01164	chr5	SE	glutamine-fructose-6-phosphate transaminase (isomerizing)	10	1
CNAG_01175	chr5	SE	hypothetical protein	7	1
CNAG_01182	chr5	SE	cytoplasmic protein	3	1
CNAG_01212	chr5	SE	hypothetical protein	9	1
CNAG_01291	chr5	SE	hypothetical protein	4	1
CNAG_01300	chr5	SE	small subunit ribosomal protein S21e	6	1
CNAG_01348	chr5	SE	cyanate hydratase	7	2
CNAG_01360	chr5	SE	pumilio domain-containing protein c	10	1
CNAG_01464	chr11	SE	Flavo-hemoglobin	7	1
CNAG_01466	chr11	SE	hypothetical protein	10	1
CNAG_01472	chr11	SE	endoplasmic reticulum protein	16	1
CNAG_01485	chr11	SE	D-lactate dehydrogenase (cytochrome)	5	1
CNAG_01523	chr11	SE	putative mitogen-activated protein kinase HOG1	7	1

CNAG_01557	chr11	SE	Calmodulin	10	1
CNAG_01558	chr11	SE	chlorophyll synthesis pathway protein BchC	6	1
CNAG_01619	chr11	SE	hypothetical protein	14	1
CNAG_01636	chr11	SE	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like 1	5	1
CNAG_01686	chr11	SE	hypothetical protein	5	1
CNAG_01736	chr11	SE	DASH complex subunit dad4	4	1
CNAG_01742	chr11	SE	aquaporin-associated protein	9	1
CNAG_01745	chr11	SE	glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD())	5	1
CNAG_01790	chr11	SE	upstream activation factor subunit UAF30	6	1
CNAG_01811	chr11	SE	hypothetical protein	8	1
CNAG_01924	chr11	SE	hypothetical protein	5	1
CNAG_01952	chr11	SE	aryl-alcohol dehydrogenase	16	2
CNAG_01961	chr11	SE	MSP domain-containing protein	5	1
CNAG_01964	chr11	SE	OPT family small oligopeptide transporter	18	1

CNAG_01986	chr11	SE	hypothetical protein	4	1
CNAG_02022	chr6	SE	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB3	5	1
CNAG_02039	chr6	SE	Integral membrane protein	7	2
CNAG_02079*	chr6	SE	cytoplasmic protein	12	1
CNAG_02116	chr6	SE	arf/Sar family protein	8	1
CNAG_02133	chr6	SE	6-phosphogluconolactonase	3	1
CNAG_02139	chr6	SE	oxysterol-binding protein	12	1
CNAG_02164	chr6	SE	hypothetical protein	5	1
CNAG_02200	chr6	SE	hypothetical protein	4	1
CNAG_02230	chr6	SE	phosphoketolase	21	1
CNAG_02240	chr6	SE	cytoplasmic protein	16	1
CNAG_02254	chr6	SE	quinic acid permease	11	1
CNAG_02261	chr6	SE	hypothetical protein	9	1
CNAG_02351	chr6	SE	endochitinase	8	1

CNAG_02359	chr6	SE	small subunit ribosomal protein S25e	4	1
CNAG_02360	chr6	SE	hypothetical protein	5	1
CNAG_02400	chr6	SE	hypothetical protein	7	1
CNAG_02439	chr6	SE	hypothetical protein	8	2
CNAG_02527	chr6	SE	multidrug transporter	15	2
CNAG_02545	chr6	SE	Inorganic pyrophosphatase	8	1
CNAG_02546	chr6	SE	transferase	5	1
CNAG_02562	chr3	SE	acyl-CoA dehydrogenase	18	1
CNAG_02575	chr3	SE	Rab small monomeric GTPase	6	1
CNAG_02685	chr3	SE	hypothetical protein	6	1
CNAG_02742	chr3	SE	dicer-like protein 1	8	1
CNAG_02751*	chr3	SE	Short-chain dehydrogenase	9	1
CNAG_02753	chr3	SE	endoplasmic reticulum protein	6	1
CNAG_02770	chr3	SE	transcription initiation factor TFIID subunit 11	4	1

CNAG_02771	chr3	SE	DNA repair and recombination protein RAD54B	25	1
CNAG_02789*	chr3	SE	nitrogen permease regulator 2	7	1
CNAG_02885	chr3	SE	capsular associated protein	9	1
CNAG_02950	chr3	SE	Grx4 family monothiol glutaredoxin	5	1
CNAG_02978	chr3	SE	hypothetical protein	5	1
CNAG_02986	chr3	SE	ADP-ribose pyrophosphatase	7	1
CNAG_02991	chr3	SE	Cofilin	6	1
CNAG_03019	chr3	SE	long-chain acyl-CoA synthetase	17	1
CNAG_03040	chr3	SE	transketolase	15	2
CNAG_03044	chr3	SE	hypothetical protein	6	2
CNAG_03049	chr3	SE	hypothetical protein	6	1
CNAG_03065	chr3	SE	ER-derived vesicles protein ERV14	7	1
CNAG_03069	chr3	SE	hydrolase	8	1
CNAG_03086*	chr8	SE	hypothetical protein	8	2

CNAG_03100	chr8	SE	cytoplasmic protein	14	1
CNAG_03110	chr8	SE	hypothetical protein	8	1
CNAG_03114	chr8	SE	hypothetical protein	3	1
CNAG_03128	chr8	SE	gamma-glutamyltransferase	13	2
CNAG_03134	chr8	SE	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	6	1
CNAG_03153	chr8	SE	SEC14 cytosolic factor	6	2
CNAG_03198	chr8	SE	small subunit ribosomal protein S8e	6	1
CNAG_03226	chr8	SE	succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial	9	1
CNAG_03243	chr8	SE	2-Nitropropane dioxygenase	12	1
CNAG_03270	chr8	SE	Adenylosuccinate lyase	11	1
CNAG_03281*	chr8	SE	glycine-rich RNA binding protein	13	3
CNAG_03321	chr8	SE	vacuolar protein sorting-associated protein 9	8	1
CNAG_03355	chr8	SE	Two-component-like sensor kinase	43	1
CNAG_03434	chr8	SE	solute carrier family 45, member 1/2/4	10	1

CNAG_03465	chr8	SE	laccase	19	1
CNAG_03566	chr8	SE	hypothetical protein	5	1
CNAG_03621	chr2	SE	Cyclophilin A	9	2
CNAG_03646	chr2	SE	phosphoribosylformimino-5-aminoimidazole carboxamide ribotide isomerase	6	1
CNAG_03666	chr2	SE	acyl-CoA dehydrogenase	13	1
CNAG_03695	chr2	SE	capsule biosynthetic protein	16	1
CNAG_03713*	chr2	SE	efflux protein EncT	16	2
CNAG_03719	chr2	SE	Putative transporter of the major facilitator superfamily (MFS)	13	1
CNAG_03770	chr2	SE	hypothetical protein	4	1
CNAG_03782	chr2	SE	hypothetical protein	5	1
CNAG_03821	chr2	SE	phosphatidylinositol 3-kinase	14	1
CNAG_03837	chr2	SE	protein-L-isoaspartate O-methyltransferase	8	1
CNAG_03844*	chr2	SE	nonselective cation channel protein	17	1
CNAG_03888	chr2	SE	hypothetical protein	15	1

CNAG_03958	chr2	SE	hypothetical protein	5	1
CNAG_04001	chr2	SE	20S proteasome subunit alpha 1	10	1
CNAG_04009	chr2	SE	aminopeptidase 2	8	1
CNAG_04030	chr2	SE	hypothetical protein	5	2
CNAG_04092	chr2	SE	Sugar transporter	11	1
CNAG_04098	chr2	SE	ATP-binding cassette, subfamily G (WHITE), member 2, PDR	20	1
CNAG_04120	chr9	SE	RNA polymerase II subunit A domain phosphatase	10	1
CNAG_04154	chr9	SE	hypothetical protein	4	1
CNAG_04189	chr9	SE	succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	10	1
CNAG_04194	chr9	SE	protein transporter SEC13	7	1
CNAG_04284	chr9	SE	hypothetical protein	8	1
CNAG_04291	chr9	SE	glycosyl-hydrolase	8	1
CNAG_04314	chr9	SE	NAD kinase	7	2
CNAG_04320	chr9	SE	polysaccharide synthase Cps1p	7	1

CNAG_04408	chr9	SE	choline kinase	6	1
CNAG_04524	chr9	SE	zinc metalloprotease	7	1
CNAG_04654	chr10	SE	UNC-50 family protein	7	1
CNAG_04656	chr10	SE	arginine-tRNA-protein transferase	9	2
CNAG_04659*	chr10	SE	Pyruvate decarboxylase	9	1
CNAG_04667	chr10	SE	hypothetical protein	3	1
CNAG_04723	chr10	SE	hypothetical protein	3	1
CNAG_04735	chr10	SE	extracellular elastinolytic metalloproteinase	6	1
CNAG_04799	chr10	SE	large subunit ribosomal protein L14e	5	1
CNAG_04814	chr10	SE	hypothetical protein	4	1
CNAG_04821*	chr10	SE	PAB-dependent poly(A)-specific ribonuclease subunit PAN3	9	1
CNAG_04850	chr10	SE	hypothetical protein	17	2
CNAG_04851	chr10	SE	transitional endoplasmic reticulum ATPase	19	1
CNAG_04867	chr10	SE	vacuolar protein	6	1

CNAG_04869	chr10	SE	para-nitrobenzyl esterase	16	1
CNAG_04883	chr10	SE	small subunit ribosomal protein S18	4	1
CNAG_04938	chr4	SE	hypothetical protein	8	2
CNAG_04953	chr4	SE	hypothetical protein	5	1
CNAG_05013	chr4	SE	RNP domain-containing protein	9	1
CNAG_05026	chr4	SE	mango esterase	13	3
CNAG_05119	chr4	SE	GABA permease	14	1
CNAG_05137	chr4	SE	ER lumen protein retaining receptor	4	1
CNAG_05146*	chr4	SE	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB9	5	1
CNAG_05167	chr4	SE	hypothetical protein	3	1
CNAG_05190	chr4	SE	hypothetical protein	7	1
CNAG_05193	chr4	SE	endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment protein 2	9	1
CNAG_05201	chr4	SE	DNA mismatch repair protein Msh4	37	1
CNAG_05218	chr4	SE	adenylyl cyclase-associated protein	9	1

CNAG_05251	chr4	SE	hypothetical protein	4	1
CNAG_05264	chr4	SE	alpha-amylase AmyA	10	2
CNAG_05273	chr4	SE	1,2-dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase	4	2
CNAG_05297	chr4	SE	hypothetical protein	3	1
CNAG_05313	chr4	SE	hypothetical protein	25	5
CNAG_05344	chr14	SE	Hemolysin	9	1
CNAG_05352	chr14	SE	acetyl-CoA transporter	7	1
CNAG_05380	chr14	SE	hypothetical protein	15	1
CNAG_05386	chr14	SE	glutamate 5-kinase	13	2
CNAG_05387	chr14	SE	galactose transporter	11	1
CNAG_05389	chr14	SE	sphinganine-1-phosphate aldolase	12	1
CNAG_05424*	chr14	SE	hypothetical protein	6	1
CNAG_05479	chr14	SE	Fungal specific transcription factor, putative	21	2
CNAG_05518	chr14	SE	exocyst complex component 4	14	1

CNAG_05533	chr14	SE	hypothetical protein	5	1
CNAG_05555*	chr14	SE	large subunit ribosomal protein L7Ae	6	1
CNAG_05578	chr14	SE	hypothetical protein	5	1
CNAG_05632	chr14	SE	hypothetical protein	4	1
CNAG_05637	chr14	SE	hypothetical protein	5	1
CNAG_05644	chr14	SE	2-Nitropropane dioxygenase	11	1
CNAG_05653	chr14	SE	malate synthase A	8	1
CNAG_05664	chr14	SE	Branched-chain-amino-acid transaminase	6	1
CNAG_05719	chr7	SE	hypothetical protein	6	1
CNAG_05734	chr7	SE	cell wall organization and biogenesis-related protein, putative	10	2
CNAG_05746	chr7	SE	Swi5-dependent recombination DNA repair protein 1	7	2
CNAG_05786	chr7	SE	hypothetical protein	7	2
CNAG_05820	chr7	SE	tryptophan aminotransferase	9	1
CNAG_05834	chr7	SE	hypothetical protein	23	2

CNAG_05851	chr7	SE	glycerol transporter	11	1
CNAG_05918	chr7	SE	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	6	1
CNAG_05930	chr7	SE	hypothetical protein	15	1
CNAG_05931	chr7	SE	protein btn1	13	1
CNAG_05938	chr7	SE	hypothetical protein	8	1
CNAG_05994*	chr12	SE	multidrug transporter	13	1
CNAG_05997	chr12	SE	hypothetical protein	3	1
CNAG_06035	chr12	SE	Alcohol dehydrogenase	10	1
CNAG_06074*	chr12	SE	cytoplasmic protein	8	2
CNAG_06075	chr12	SE	hypothetical protein	5	1
CNAG_06109*	chr12	SE	hypothetical protein	6	2
CNAG_06113	chr12	SE	hypothetical protein	5	1
CNAG_06148	chr12	SE	hypothetical protein	19	1
CNAG_06240	chr12	SE	protein disulfide-isomerase	9	1

CNAG_06333	chr13	SE	replication factor C subunit 3/5	12	2
CNAG_06404	chr13	SE	hypothetical protein	3	1
CNAG_06419	chr13	SE	hypothetical protein	6	1
CNAG_06420	chr13	SE	solute carrier family 25 (mitochondrial citrate transporter), member 1	8	1
CNAG_06432	chr13	SE	Acetate kinase	8	1
CNAG_06438	chr13	SE	hypothetical protein	11	1
CNAG_06447	chr13	SE	Large subunit ribosomal protein L17, putative	6	1
CNAG_06501	chr13	SE	1,3-beta-glucanosyltransferase	12	1
CNAG_06531	chr7	SE	hypothetical protein	11	2
CNAG_06605	chr7	SE	small subunit ribosomal protein S2	4	1
CNAG_06632	chr7	SE	Atypical/ABC1 protein kinase	11	1
CNAG_06646	chr7	SE	protein yop1	6	1
CNAG_06647	chr7	SE	hypothetical protein	5	1
CNAG_06666	chr7	SE	starch phosphorylase	21	1

CNAG_06676	chr7	SE	hypothetical protein	7	1
CNAG_06685	chr7	SE	U2-associated protein SR140	12	1
CNAG_06728	chr2	SE	kinesin	14	1
CNAG_06737*	chr2	SE	vacuolar protein sorting-associated protein	14	2
CNAG_06794	chr2	SE	hypothetical protein	3	1
CNAG_06862*	chr5	SE	vacuolar protein	8	3
CNAG_06871	chr5	SE	hypothetical protein	10	1
CNAG_06888	chr3	SE	cytoplasmic protein	10	1
CNAG_06919	chr3	SE	rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin	5	1
CNAG_06920	chr3	SE	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 10	5	1
CNAG_06926	chr3	SE	hypothetical protein	16	1
CNAG_06946	chr5	SE	hypothetical protein	9	1
CNAG_07004	chr5	SE	dihydrolipoyl dehydrogenase	12	1
CNAG_07011	chr12	SE	hypothetical protein	21	2

CNAG_07332	chr1	SE	hypothetical protein	11	2
CNAG_07346	chr1	SE	T-complex protein 1 subunit eta	8	1
CNAG_07368	chr1	SE	calcium activated cation channel protein	19	1
CNAG_07403	chr5	SE	Peroxisomal ATPase PEX1	15	1
CNAG_07405	chr5	SE	hypothetical protein	7	2
CNAG_07456	chr5	SE	hypothetical protein	9	2
CNAG_07481	chr2	SE	hypothetical protein	8	1
CNAG_07541*	chr3	SE	proteasome assembly chaperone 2	8	1
CNAG_07547*	chr3	SE	hypothetical protein	11	1
CNAG_07570	chr3	SE	prenylated SNARE protein Ykt6p	5	1
CNAG_07593	chr11	SE	hypothetical protein	11	1
CNAG_07638	chr6	SE	hypothetical protein	7	1
CNAG_07682	chr7	SE	hypothetical protein	16	2
CNAG_07740	chr8	SE	hypothetical protein	6	1

CNAG_07741	chr8	SE	cytoplasmic protein	13	1
CNAG_07758	chr9	SE	hypothetical protein	32	1
CNAG_07830	chr4	SE	hypothetical protein	12	2
CNAG_07851	chr10	SE	isocitrate dehydrogenase, NAD-dependent	8	1
CNAG_07943	chr13	SE	hypothetical protein	5	1
CNAG_08008*	chr11	SE	hypothetical protein	24	1
CNAG_08013	chr11	SE	hypothetical protein	13	1
CNAG_12354	chr4	SE	unspecified product	9	1
CNAG_12489	chr5	SE	unspecified product	4	1
CNAG_12516	chr6	SE	unspecified product	5	1
CNAG_12629	chr7	SE	unspecified product	7	1
CNAG_12726	chr8	SE	unspecified product	5	1
CNAG_13043	chr11	SE	unspecified product	8	1
CNAG_13080	chr12	SE	unspecified product	3	1

*Gene apresentou mais de um transcrito sofrendo o tipo de AS correspondente.

Tabela S5: Localização genômica, tipo de AS, anotação e número de exons e transcritos dos genes de *C. neoformans* que apresentaram DAS na comparação 6h vs. 10d, de acordo com o banco de dados FungiDB.

GeneID	Cromossomo	Tipo de AS	Descrição	Número de éxons no gene	Número de transcritos anotados
CNAG_00030	1	A3'SS	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	7	2
CNAG_00031	1	A3'SS	hypothetical protein	13	2
CNAG_00422	1	A3'SS	hypothetical protein	13	2
CNAG_00522	1	A3'SS	C2 domain-containing protein	9	2
CNAG_00681	1	A3'SS	condensin complex subunit 3	15	2
CNAG_00687	1	A3'SS	hypothetical protein, variant	10	2
CNAG_00732	1	A3'SS	hypothetical protein	9	3
CNAG_00736	1	A3'SS	exocyst protein	16	2
CNAG_00889	5	A3'SS	hypothetical protein	5	2
CNAG_00906	5	A3'SS	nucleolar pre-ribosomal-associated protein 1	16	2

CNAG_00936	5	A3'SS	lipid particle protein	12	2
CNAG_00937	5	A3'SS	hypothetical protein	9	3
CNAG_00979	5	A3'SS	Copper uptake transporter	9	4
CNAG_00995	5	A3'SS	hypothetical protein	8	2
CNAG_01004	5	A3'SS	hypothetical protein	8	3
CNAG_01030	5	A3'SS	hypothetical protein	3	2
CNAG_01059	5	A3'SS	vacuolar membrane protein	8	2
CNAG_01191*	5	A3'SS	long-chain fatty acid transporter, variant 1	8	3
CNAG_01235	5	A3'SS	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB2, variant	8	2
CNAG_01278	5	A3'SS	Aminophospholipid translocase, putative	16	2
CNAG_01303	5	A3'SS	hypothetical protein	3	2
CNAG_01314	5	A3'SS	vacuolar protein, variant	23	2
CNAG_01336	5	A3'SS	hypothetical protein	21	2
CNAG_01376	5	A3'SS	stress response protein NST1	6	2

CNAG_01512	11	A3'SS	hypothetical protein	9	2
CNAG_01573	11	A3'SS	hypothetical protein	13	2
CNAG_01608	11	A3'SS	nuclear GTP-binding protein	9	2
CNAG_01642	11	A3'SS	DNA mismatch repair protein MSH3	30	2
CNAG_01827*	11	A3'SS	hypothetical protein, variant 1	23	4
CNAG_01952	11	A3'SS	aryl-alcohol dehydrogenase	16	2
CNAG_02143	6	A3'SS	hypothetical protein	7	2
CNAG_02203	6	A3'SS	karyopherin/importin that interacts with the nuclear pore complex	18	2
CNAG_02224	6	A3'SS	hypothetical protein	6	2
CNAG_02302	6	A3'SS	hypothetical protein	6	2
CNAG_02318	6	A3'SS	hypothetical protein, variant	9	2
CNAG_02324	6	A3'SS	hypothetical protein	10	2
CNAG_02387	6	A3'SS	hypothetical protein	8	2
CNAG_02420	6	A3'SS	hypothetical protein, variant	5	2

CNAG_02427	6	A3'SS	hypothetical protein	9	2
CNAG_02476	6	A3'SS	putative transcription factor	22	2
CNAG_02510*	6	A3'SS	hypothetical protein	8	3
CNAG_02528	6	A3'SS	hypothetical protein	4	2
CNAG_02579	3	A3'SS	ARID-containing regulator of virulence traits and carbon assimilation	8	2
CNAG_02810	3	A3'SS	pumilio-family RNA binding protein	10	2
CNAG_02818	3	A3'SS	Glycine cleavage system T protein	7	2
CNAG_02859	3	A3'SS	NADH kinase	14	4
CNAG_02941	3	A3'SS	hypothetical protein	13	2
CNAG_02953	3	A3'SS	tuberin	10	2
CNAG_03016	3	A3'SS	chaperone regulator	8	2
CNAG_03024	3	A3'SS	AGC protein kinase	12	2
CNAG_03032	3	A3'SS	dynactin 2	6	2
CNAG_03043	3	A3'SS	hypothetical protein	7	3

CNAG_03086	8	A3'SS	hypothetical protein	8	2
CNAG_03120	8	A3'SS	alpha-1,3-glucan synthase	15	2
CNAG_03239	8	A3'SS	hypothetical protein	7	2
CNAG_03314	8	A3'SS	YTH domain family 2, variant	8	2
CNAG_03404	8	A3'SS	hypothetical protein	7	2
CNAG_03461	8	A3'SS	hypothetical protein, variant	10	2
CNAG_03545	8	A3'SS	hypothetical protein, variant 2	6	3
CNAG_03645	2	A3'SS	NET1-associated nuclear protein 1 (U3 small nucleolar RNA-associated protein 17)	8	2
CNAG_03756	2	A3'SS	hypothetical protein	16	2
CNAG_03775	2	A3'SS	hypothetical protein	10	3
CNAG_03830	2	A3'SS	hypothetical protein	12	3
CNAG_03839	2	A3'SS	CCR4-NOT transcription complex subunit 4	12	3
CNAG_03953	2	A3'SS	Sua5/YciO/YrdC/YwIC family protein	3	2
CNAG_04143	9	A3'SS	hypothetical protein	8	2

CNAG_04224	9	A3'SS	carboxy-terminal domain RNA polymerase II polypeptide A small phosphatase	7	2
CNAG_04339	9	A3'SS	exocyst complex component exo84	10	2
CNAG_04404	9	A3'SS	hypothetical protein	18	2
CNAG_04465	9	A3'SS	small nuclear ribonucleoprotein	7	2
CNAG_04545	9	A3'SS	CTD kinase subunit gamma	7	2
CNAG_04786	10	A3'SS	hypothetical protein	5	2
CNAG_04848	10	A3'SS	mRNA binding protein	11	2
CNAG_05161	4	A3'SS	hypothetical protein	7	2
CNAG_05238	4	A3'SS	hypothetical protein	5	2
CNAG_05304	4	A3'SS	hypothetical protein	14	3
CNAG_05313	4	A3'SS	hypothetical protein	25	5
CNAG_05406	14	A3'SS	cell cycle arrest protein BUB2	9	2
CNAG_05413	14	A3'SS	phosphatidylinositol glycan, class Q	14	2
CNAG_05479	14	A3'SS	Fungal specific transcription factor, putative	21	2

CNAG_05673	7	A3'SS	GPI inositol-deacylase	10	2
CNAG_05747	7	A3'SS	vacuolar protein sorting-associated protein VTA1	10	3
CNAG_05771	7	A3'SS	serine/threonine-protein kinase TEL1	12	2
CNAG_05882	7	A3'SS	class E vacuolar protein-sorting machinery protein HSE1	13	2
CNAG_05928	7	A3'SS	hypothetical protein	4	2
CNAG_06109	12	A3'SS	hypothetical protein	6	2
CNAG_06310	13	A3'SS	CAMK/CAMKL protein kinase	12	3
CNAG_06450	13	A3'SS	hypothetical protein	9	2
CNAG_06524	7	A3'SS	hypothetical protein	14	2
CNAG_06531	7	A3'SS	hypothetical protein	11	2
CNAG_06622	7	A3'SS	hypothetical protein	7	2
CNAG_06697	7	A3'SS	TTK protein kinase	11	2
CNAG_06727	2	A3'SS	hypothetical protein	12	3
CNAG_06831	5	A3'SS	hypothetical protein	6	2

CNAG_06862	5	A3'SS	vacuolar protein	8	3
CNAG_06978	8	A3'SS	cytoplasmic protein	6	2
CNAG_07015	5	A3'SS	hypothetical protein	9	2
CNAG_07332	1	A3'SS	hypothetical protein	11	2
CNAG_07419	5	A3'SS	hypothetical protein	4	2
CNAG_07434	5	A3'SS	HAD hydrolase, family IIID	11	2
CNAG_07573	3	A3'SS	DNA ligase 4	31	2
CNAG_07682	7	A3'SS	hypothetical protein	16	2
CNAG_07755	9	A3'SS	hypothetical protein	7	3
CNAG_07830	4	A3'SS	hypothetical protein	12	2
CNAG_07845*	10	A3'SS	hypothetical protein	4	3
CNAG_07881	14	A3'SS	hypothetical protein	8	3
CNAG_07940	13	A3'SS	hypothetical protein	4	2
CNAG_07950*	1	A3'SS	hypothetical protein	7	3

CNAG_07989	7	A3'SS	Velvet-like factor, putative	11	2
CNAG_01152	5	A5'SS	small subunit ribosomal protein S6e	6	2
CNAG_01570	11	A5'SS	hypothetical protein	17	2
CNAG_01739	11	A5'SS	hypothetical protein	9	2
CNAG_02105	6	A5'SS	methylated-DNA-protein-cysteine methyltransferase	5	2
CNAG_02484	6	A5'SS	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	6	2
CNAG_02552	6	A5'SS	transketolase	14	3
CNAG_04028	2	A5'SS	RNA binding protein	11	2
CNAG_05304	4	A5'SS	hypothetical protein	14	3
CNAG_06065	12	A5'SS	inositol polyphosphate-5-phosphatase F	11	2
CNAG_06161	12	A5'SS	hypothetical protein	13	2
CNAG_00024*	1	RI	hypothetical protein	8	3
CNAG_00026	1	RI	kynurenine aminotransferase	9	2
CNAG_00303*	1	RI	high-affinity nicotinic acid transporter	19	2

CNAG_00305	1	RI	chaperone activator	9	2
CNAG_00732	1	RI	hypothetical protein	9	3
CNAG_00834	1	RI	Phosphatidylserine decarboxylase	7	2
CNAG_00877	5	RI	Adenylate kinase	11	2
CNAG_00998	5	RI	hypothetical protein	8	2
CNAG_01004*	5	RI	hypothetical protein	8	3
CNAG_01055	5	RI	phospholipid transporter	19	2
CNAG_01244	5	RI	hypothetical protein	7	2
CNAG_01295	5	RI	acyl carrier protein	7	2
CNAG_01297*	5	RI	hypothetical protein	18	3
CNAG_01299	5	RI	hypothetical protein	12	2
CNAG_01334	5	RI	hypothetical protein	9	2
CNAG_01490	11	RI	hypothetical protein	4	2
CNAG_01675	11	RI	tagatose-bisphosphate aldolase	10	2

CNAG_01690	11	RI	MFS transporter	24	3
CNAG_01696	11	RI	chaperone DnaJ	7	2
CNAG_01753	11	RI	hypothetical protein	7	2
CNAG_01827	11	RI	hypothetical protein	23	4
CNAG_02012	11	RI	TPR repeat-containing protein	4	2
CNAG_02174	6	RI	signal recognition particle protein SRP54	13	3
CNAG_02388	6	RI	hypothetical protein	5	2
CNAG_02438	6	RI	hypothetical protein	9	2
CNAG_02476	6	RI	putative transcription factor	22	2
CNAG_02516	6	RI	hypothetical protein	7	3
CNAG_02552*	6	RI	transketolase	14	3
CNAG_02705*	3	RI	hypothetical protein	9	3
CNAG_02806	3	RI	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 1	8	2
CNAG_02996*	3	RI	flavoprotein oxygenase	17	3

CNAG_03036	3	RI	potassium ion transporter	16	2
CNAG_03037	3	RI	hypothetical protein	10	2
CNAG_03163	8	RI	hypothetical protein	11	3
CNAG_03181	8	RI	hypothetical protein	4	2
CNAG_03234	8	RI	cell wall surface anchor protein	4	2
CNAG_03247	8	RI	sterol 3beta-glucosyltransferase	17	2
CNAG_03313	8	RI	hypothetical protein	4	2
CNAG_03414	8	RI	hypothetical protein	12	2
CNAG_03543	8	RI	hypothetical protein	7	2
CNAG_03771	2	RI	DNA binding protein Ncp1	8	2
CNAG_03793	2	RI	hypothetical protein	5	2
CNAG_03830	2	RI	hypothetical protein	12	3
CNAG_03883	2	RI	hypothetical protein	4	2
CNAG_03912	2	RI	Putative major facilitator superfamily (MFS) transporter	9	2

CNAG_03914	2	RI	hypothetical protein	12	2
CNAG_04226	9	RI	U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein 1	7	2
CNAG_04380	9	RI	peptidase	6	2
CNAG_04468	9	RI	Tartrate dehydrogenase	8	2
CNAG_04618	10	RI	hypothetical protein	9	2
CNAG_04759	10	RI	hypothetical protein	8	2
CNAG_04868	10	RI	cytoplasmic protein	8	2
CNAG_05156	4	RI	hypothetical protein	9	2
CNAG_05161	4	RI	hypothetical protein	7	2
CNAG_05266	4	RI	membrane protein	5	2
CNAG_05308	4	RI	beta-catenin-like protein 1	6	2
CNAG_05510	14	RI	hypothetical protein	6	2
CNAG_05529	14	RI	hypothetical protein	5	2
CNAG_05748	7	RI	NuA3 HAT complex component NTO1	18	2

CNAG_06124	12	RI	hypothetical protein	4	2
CNAG_06159	12	RI	hypothetical protein	5	2
CNAG_06184	12	RI	hypothetical protein	10	2
CNAG_06290	13	RI	Low-affinity glucose transporter HXT2	18	2
CNAG_06395	13	RI	hypothetical protein	5	2
CNAG_06463	13	RI	hypothetical protein	4	2
CNAG_06588	7	RI	hypothetical protein	9	2
CNAG_06650	7	RI	hypothetical protein	7	2
CNAG_06784	2	RI	hypothetical protein	7	2
CNAG_06818	5	RI	Putative Zn(II)2Cys6 transcription factor	12	3
CNAG_06864	5	RI	hypothetical protein	4	2
CNAG_07011	12	RI	hypothetical protein	21	2
CNAG_07344	1	RI	ras guanyl-nucleotide exchange factor	17	2
CNAG_07466	2	RI	U3 small nucleolar RNA-associated protein 7	8	3

CNAG_07505	3	RI	hypothetical protein	8	2
CNAG_07520	3	RI	endopeptidase	17	3
CNAG_07537	3	RI	mitochondrial GTPase 1	7	2
CNAG_07730	8	RI	tricarboxylate transporter	7	2
CNAG_07954	1	RI	hypothetical protein	6	3
CNAG_00130	1	SE	CAMK/CAMK1/CAMK1-RCK protein kinase	10	1
CNAG_00303	1	SE	high-affinity nicotinic acid transporter	19	2
CNAG_00867	5	SE	myo-inositol transporter, putative	12	3
CNAG_02230	6	SE	phosphoketolase	21	1
CNAG_02562	3	SE	acyl-CoA dehydrogenase	18	1
CNAG_02751	3	SE	Short-chain dehydrogenase	9	1
CNAG_02770	3	SE	transcription initiation factor TFIID subunit 11	4	1
CNAG_03044	3	SE	hypothetical protein	6	2
CNAG_03114	8	SE	hypothetical protein	3	1

CNAG_03128	8	SE	gamma-glutamyltransferase	13	2
CNAG_03281	8	SE	glycine-rich RNA binding protein	13	3
CNAG_03713	2	SE	efflux protein EncT	16	2
CNAG_04408	9	SE	choline kinase	6	1
CNAG_04723	10	SE	hypothetical protein	3	1
CNAG_04851	10	SE	transitional endoplasmic reticulum ATPase	19	1
CNAG_05095	4	SE	pod-specific dehydrogenase SAC25	7	1
CNAG_05273	4	SE	1,2-dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase	4	2
CNAG_05313	4	SE	hypothetical protein	25	5
CNAG_05931	7	SE	protein btn1	13	1
CNAG_05994*	12	SE	multidrug transporter	13	1
CNAG_06862*	5	SE	vacuolar protein	8	3
CNAG_07346	1	SE	T-complex protein 1 subunit eta	8	1
CNAG_07547	3	SE	hypothetical protein	11	1

CNAG_07682	7	SE	hypothetical protein	16	2
CNAG_07943	13	SE	hypothetical protein	5	1

***Gene apresentou mais de um transcrito sofrendo o tipo de AS correspondente.**

Tabela S6: Localização genômica, tipo de AS, anotação e número de exons e transcritos dos genes de *C. neoformans* que apresentaram DAS na comparação 10d vs. YPD, de acordo com o banco de dados FungiDB.

GeneID	Cromossomo	Tipo de AS	Produto pós transcrição	Número de éxons no gene	Número de transcritos anotados
CNAG_00031	1	A3'SS	hypothetical protein	13	2
CNAG_00732	1	A3'SS	hypothetical protein	9	3
CNAG_00736	1	A3'SS	exocyst protein	16	2
CNAG_00936	5	A3'SS	lipid particle protein	12	2
CNAG_01278	5	A3'SS	Aminophospholipid translocase, putative	16	2
CNAG_01314	5	A3'SS	vacuolar protein	23	2

CNAG_01573	11	A3'SS	hypothetical protein	13	2
CNAG_01642	11	A3'SS	DNA mismatch repair protein MSH3	30	2
CNAG_01827*	11	A3'SS	hypothetical protein	23	4
CNAG_02143	6	A3'SS	hypothetical protein	7	2
CNAG_02224	6	A3'SS	hypothetical protein	6	2
CNAG_02302	6	A3'SS	hypothetical protein	6	2
CNAG_02318	6	A3'SS	hypothetical protein	9	2
CNAG_02427	6	A3'SS	hypothetical protein	9	2
CNAG_02579	3	A3'SS	ARID-containing regulator of virulence traits and carbon assimilation	8	2
CNAG_02859	3	A3'SS	NADH kinase	14	4
CNAG_02941	3	A3'SS	hypothetical protein	13	2
CNAG_03032	3	A3'SS	dynactin 2	6	2
CNAG_03120	8	A3'SS	alpha-1,3-glucan synthase	15	2
CNAG_03314	8	A3'SS	YTH domain family 2	8	2

CNAG_03461	8	A3'SS	hypothetical protein	10	2
CNAG_03775	2	A3'SS	hypothetical protein	10	3
CNAG_03839	2	A3'SS	CCR4-NOT transcription complex subunit 4	12	3
CNAG_04143	9	A3'SS	hypothetical protein	8	2
CNAG_04545	9	A3'SS	CTD kinase subunit gamma	7	2
CNAG_05413	14	A3'SS	phosphatidylinositol glycan, class Q	14	2
CNAG_05771	7	A3'SS	serine/threonine-protein kinase TEL1	12	2
CNAG_06727	2	A3'SS	hypothetical protein	12	3
CNAG_07015	5	A3'SS	hypothetical protein	9	2
CNAG_07332	1	A3'SS	hypothetical protein	11	2
CNAG_07434	5	A3'SS	HAD hydrolase, family IIID	11	2
CNAG_07682	7	A3'SS	hypothetical protein	16	2
CNAG_07830	4	A3'SS	hypothetical protein	12	2
CNAG_00030	1	A3'SS	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	7	2

CNAG_00422	1	A3'SS	hypothetical protein	13	2
CNAG_00522	1	A3'SS	C2 domain-containing protein	9	2
CNAG_00681	1	A3'SS	condensin complex subunit 3	15	2
CNAG_00687	1	A3'SS	hypothetical protein	10	2
CNAG_00889	5	A3'SS	hypothetical protein	5	2
CNAG_00906	5	A3'SS	nucleolar pre-ribosomal-associated protein 1	16	2
CNAG_00937	5	A3'SS	hypothetical protein	9	3
CNAG_00979	5	A3'SS	Copper uptake transporter	9	4
CNAG_00995	5	A3'SS	hypothetical protein	8	2
CNAG_01004	5	A3'SS	hypothetical protein	8	3
CNAG_01030	5	A3'SS	hypothetical protein	3	2
CNAG_01059	5	A3'SS	vacuolar membrane protein	8	2
CNAG_01191*	5	A3'SS	long-chain fatty acid transporter	8	3
CNAG_01235	5	A3'SS	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB2	8	2

CNAG_01303	5	A3'SS	hypothetical protein	3	2
CNAG_01336	5	A3'SS	hypothetical protein	21	2
CNAG_01376	5	A3'SS	stress response protein NST1	6	2
CNAG_01512	11	A3'SS	hypothetical protein	9	2
CNAG_01608	11	A3'SS	nuclear GTP-binding protein	9	2
CNAG_01952	11	A3'SS	aryl-alcohol dehydrogenase	16	2
CNAG_02203	6	A3'SS	karyopherin/importin that interacts with the nuclear pore complex	18	2
CNAG_02324	6	A3'SS	hypothetical protein	10	2
CNAG_02387	6	A3'SS	hypothetical protein	8	2
CNAG_02420	6	A3'SS	hypothetical protein	5	2
CNAG_02476	6	A3'SS	putative transcription factor	22	2
CNAG_02510*	6	A3'SS	hypothetical protein	8	3
CNAG_02528	6	A3'SS	hypothetical protein	4	2
CNAG_02810	3	A3'SS	pumilio-family RNA binding protein	10	2

CNAG_02818	3	A3'SS	Glycine cleavage system T protein	7	2
CNAG_02953	3	A3'SS	tuberin	10	2
CNAG_03016	3	A3'SS	chaperone regulator	8	2
CNAG_03024	3	A3'SS	AGC protein kinase	12	2
CNAG_03043	3	A3'SS	hypothetical protein	7	3
CNAG_03086	8	A3'SS	hypothetical protein	8	2
CNAG_03239	8	A3'SS	hypothetical protein	7	2
CNAG_03404	8	A3'SS	hypothetical protein	7	2
CNAG_03545	8	A3'SS	hypothetical protein	6	3
CNAG_03645	2	A3'SS	NET1-associated nuclear protein 1 (U3 small nucleolar RNA-associated protein 17)	8	2
CNAG_03756	2	A3'SS	hypothetical protein	16	2
CNAG_03830	2	A3'SS	hypothetical protein	12	3
CNAG_03953	2	A3'SS	Sua5/YciO/YrdC/YwC family protein	3	2

CNAG_04224	9	A3'SS	carboxy-terminal domain RNA polymerase II polypeptide A small phosphatase	7	2
CNAG_04339	9	A3'SS	exocyst complex component exo84	10	2
CNAG_04404	9	A3'SS	hypothetical protein	18	2
CNAG_04465	9	A3'SS	small nuclear ribonucleoprotein	7	2
CNAG_04786	10	A3'SS	hypothetical protein	5	2
CNAG_04848	10	A3'SS	mRNA binding protein	11	2
CNAG_05161	4	A3'SS	hypothetical protein	7	2
CNAG_05238	4	A3'SS	hypothetical protein	5	2
CNAG_05304	4	A3'SS	hypothetical protein	14	3
CNAG_05313	4	A3'SS	hypothetical protein	25	5
CNAG_05406	14	A3'SS	cell cycle arrest protein BUB2	9	2
CNAG_05479	14	A3'SS	Fungal specific transcription factor, putative	21	2
CNAG_05673	7	A3'SS	GPI inositol-deacylase	10	2
CNAG_05747	7	A3'SS	vacuolar protein sorting-associated protein VTA1	10	3

CNAG_05882	7	A3'SS	class E vacuolar protein-sorting machinery protein HSE1	13	2
CNAG_05928	7	A3'SS	hypothetical protein	4	2
CNAG_06109	12	A3'SS	hypothetical protein	6	2
CNAG_06310	13	A3'SS	CAMK/CAMKL protein kinase	12	3
CNAG_06450	13	A3'SS	hypothetical protein	9	2
CNAG_06524	7	A3'SS	hypothetical protein	14	2
CNAG_06531	7	A3'SS	hypothetical protein	11	2
CNAG_06622	7	A3'SS	hypothetical protein	7	2
CNAG_06697	7	A3'SS	TTK protein kinase	11	2
CNAG_06831	5	A3'SS	hypothetical protein	6	2
CNAG_06862	5	A3'SS	vacuolar protein	8	3
CNAG_06978	8	A3'SS	cytoplasmic protein	6	2
CNAG_07419	5	A3'SS	hypothetical protein	4	2
CNAG_07573	3	A3'SS	DNA ligase 4	31	2

CNAG_07755	9	A3'SS	hypothetical protein	7	3
CNAG_07845*	10	A3'SS	hypothetical protein	4	3
CNAG_07881	14	A3'SS	hypothetical protein	8	3
CNAG_07940	13	A3'SS	hypothetical protein	4	2
CNAG_07950*	1	A3'SS	hypothetical protein	7	3
CNAG_07989	7	A3'SS	Velvet-like factor, putative	11	2
CNAG_01570	11	A5'SS	hypothetical protein	17	2
CNAG_01152	5	A5'SS	small subunit ribosomal protein S6e	6	2
CNAG_01739	11	A5'SS	hypothetical protein	9	2
CNAG_02105	6	A5'SS	methylated-DNA-protein-cysteine methyltransferase	5	2
CNAG_02484	6	A5'SS	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	6	2
CNAG_02552	6	A5'SS	transketolase	14	3
CNAG_04028	2	A5'SS	RNA binding protein	11	2
CNAG_05304	4	A5'SS	hypothetical protein	14	3

CNAG_06065	12	A5'SS	inositol polyphosphate-5-phosphatase F	11	2
CNAG_06161	12	A5'SS	hypothetical protein	13	2
CNAG_05146	4	MXE	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB9	5	1
CNAG_00026	1	RI	kynurenine aminotransferase	9	2
CNAG_00303*	1	RI	high-affinity nicotinic acid transporter	19	2
CNAG_00732	1	RI	hypothetical protein	9	3
CNAG_00998	5	RI	hypothetical protein	8	2
CNAG_01299	5	RI	hypothetical protein	12	2
CNAG_01334	5	RI	hypothetical protein	9	2
CNAG_01827	11	RI	hypothetical protein	23	4
CNAG_02705*	3	RI	hypothetical protein	9	3
CNAG_02996*	3	RI	flavoprotein oxygenase	17	3
CNAG_03036	3	RI	potassium ion transporter	16	2
CNAG_03181	8	RI	hypothetical protein	4	2

CNAG_03914	2	RI	hypothetical protein	12	2
CNAG_04618	10	RI	hypothetical protein	9	2
CNAG_04759	10	RI	hypothetical protein	8	2
CNAG_05156	4	RI	hypothetical protein	9	2
CNAG_05266	4	RI	membrane protein	5	2
CNAG_05308	4	RI	beta-catenin-like protein 1	6	2
CNAG_05510	14	RI	hypothetical protein	6	2
CNAG_05748	7	RI	NuA3 HAT complex component NTO1	18	2
CNAG_06650	7	RI	hypothetical protein	7	2
CNAG_07505	3	RI	hypothetical protein	8	2
CNAG_00024*	1	RI	hypothetical protein	8	3
CNAG_00305	1	RI	chaperone activator	9	2
CNAG_00834	1	RI	Phosphatidylserine decarboxylase	7	2
CNAG_00877	5	RI	Adenylate kinase	11	2

CNAG_01004*	5	RI	hypothetical protein	8	3
CNAG_01055	5	RI	phospholipid transporter	19	2
CNAG_01244	5	RI	hypothetical protein	7	2
CNAG_01295	5	RI	acyl carrier protein	7	2
CNAG_01297*	5	RI	hypothetical protein	18	3
CNAG_01490	11	RI	hypothetical protein	4	2
CNAG_01675	11	RI	tagatose-bisphosphate aldolase	10	2
CNAG_01690	11	RI	MFS transporter	24	3
CNAG_01696	11	RI	chaperone DnaJ	7	2
CNAG_01753	11	RI	hypothetical protein	7	2
CNAG_02012	11	RI	TPR repeat-containing protein	4	2
CNAG_02174	6	RI	signal recognition particle protein SRP54	13	3
CNAG_02388	6	RI	hypothetical protein	5	2
CNAG_02438	6	RI	hypothetical protein	9	2

CNAG_02476	6	RI	putative transcription factor	22	2
CNAG_02516	6	RI	hypothetical protein	7	3
CNAG_02552*	6	RI	transketolase	14	3
CNAG_02806	3	RI	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 1	8	2
CNAG_03037	3	RI	hypothetical protein	10	2
CNAG_03163	8	RI	hypothetical protein	11	3
CNAG_03234	8	RI	cell wall surface anchor protein	4	2
CNAG_03247	8	RI	sterol 3beta-glucosyltransferase	17	2
CNAG_03313	8	RI	hypothetical protein	4	2
CNAG_03414	8	RI	hypothetical protein	12	2
CNAG_03543	8	RI	hypothetical protein	7	2
CNAG_03771	2	RI	DNA binding protein Ncp1	8	2
CNAG_03793	2	RI	hypothetical protein	5	2
CNAG_03830	2	RI	hypothetical protein	12	3

CNAG_03883	2	RI	hypothetical protein	4	2
CNAG_03912	2	RI	Putative major facilitator superfamily (MFS) transporter	9	2
CNAG_04226	9	RI	U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein 1	7	2
CNAG_04380	9	RI	peptidase	6	2
CNAG_04468	9	RI	Tartrate dehydrogenase	8	2
CNAG_04868	10	RI	cytoplasmic protein	8	2
CNAG_05161	4	RI	hypothetical protein	7	2
CNAG_05529	14	RI	hypothetical protein	5	2
CNAG_05734	7	RI	cell wall organization and biogenesis-related protein, putative	10	2
CNAG_06124	12	RI	hypothetical protein	4	2
CNAG_06159	12	RI	hypothetical protein	5	2
CNAG_06184	12	RI	hypothetical protein	10	2
CNAG_06290	13	RI	Low-affinity glucose transporter HXT2	18	2
CNAG_06395	13	RI	hypothetical protein	5	2

CNAG_06463	13	RI	hypothetical protein	4	2
CNAG_06588	7	RI	hypothetical protein	9	2
CNAG_06784	2	RI	hypothetical protein	7	2
CNAG_06818	5	RI	Putative Zn(II) ₂ Cys ₆ transcription factor	12	3
CNAG_06864	5	RI	hypothetical protein	4	2
CNAG_07011	12	RI	hypothetical protein	21	2
CNAG_07344	1	RI	ras guanyl-nucleotide exchange factor	17	2
CNAG_07466	2	RI	U3 small nucleolar RNA-associated protein 7	8	3
CNAG_07520	3	RI	endopeptidase	17	3
CNAG_07537	3	RI	mitochondrial GTPase 1	7	2
CNAG_07730	8	RI	tricarboxylate transporter	7	2
CNAG_07954	1	RI	hypothetical protein	6	3
CNAG_00036*	1	SE	SEC14 cytosolic factor	8	1
CNAG_00057*	1	SE	fructose-1,6-bisphosphatase I	5	1

CNAG_00085	1	SE	histone chaperone ASF1	6	1
CNAG_00088	1	SE	prohibitin PHB1	9	1
CNAG_00139	1	SE	hypothetical protein	8	1
CNAG_00235	1	SE	amt family ammonium transporter	12	1
CNAG_00258	1	SE	Fungal gamma tubulin complex family protein	10	1
CNAG_00303	1	SE	high-affinity nicotinic acid transporter	19	2
CNAG_00398	1	SE	hypothetical protein	5	1
CNAG_00418	1	SE	S-adenosylmethionine synthase	5	1
CNAG_00507	1	SE	nitrilase	8	1
CNAG_00517	1	SE	hypothetical protein	6	1
CNAG_00587	1	SE	hypothetical protein	4	1
CNAG_00722	1	SE	large subunit ribosomal protein L27	3	1
CNAG_00792	1	SE	ATP-binding cassette transporter	34	1
CNAG_00819	1	SE	small subunit ribosomal protein S30	4	1

CNAG_00821	1	SE	large subunit ribosomal protein L34e	5	1
CNAG_00848	1	SE	hypothetical protein	13	3
CNAG_00866	5	SE	transketolase	16	2
CNAG_00867	5	SE	myo-inositol transporter, putative	12	3
CNAG_00886	5	SE	Adenosylhomocysteinase	7	1
CNAG_00936	5	SE	lipid particle protein	12	2
CNAG_01025	5	SE	hypothetical protein	6	1
CNAG_01102	5	SE	oxidoreductase	5	1
CNAG_01164	5	SE	glutamine-fructose-6-phosphate transaminase (isomerizing)	10	1
CNAG_01175	5	SE	hypothetical protein	7	1
CNAG_01182	5	SE	cytoplasmic protein	3	1
CNAG_01348	5	SE	cyanate hydratase	7	2
CNAG_01360	5	SE	pumilio domain-containing protein c	10	1
CNAG_01464	11	SE	Flavo-hemoglobin	7	1

CNAG_01466	11	SE	hypothetical protein	10	1
CNAG_01472	11	SE	endoplasmic reticulum protein	16	1
CNAG_01485	11	SE	D-lactate dehydrogenase (cytoome)	5	1
CNAG_01523	11	SE	putative mitogen-activated protein kinase HOG1	7	1
CNAG_01636	11	SE	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like 1	5	1
CNAG_01686	11	SE	hypothetical protein	5	1
CNAG_01736	11	SE	DASH complex subunit dad4	4	1
CNAG_01742	11	SE	aquaporin-associated protein	9	1
CNAG_01790	11	SE	upstream activation factor subunit UAF30	6	1
CNAG_01924	11	SE	hypothetical protein	5	1
CNAG_01964	11	SE	OPT family small oligopeptide transporter	18	1
CNAG_01986	11	SE	hypothetical protein	4	1
CNAG_02022	6	SE	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB3	5	1
CNAG_02039	6	SE	Integral membrane protein	7	2

CNAG_02079*	6	SE	cytoplasmic protein	12	1
CNAG_02116	6	SE	arf/Sar family protein	8	1
CNAG_02139	6	SE	oxysterol-binding protein	12	1
CNAG_02230	6	SE	phosphoketolase	21	1
CNAG_02240	6	SE	cytoplasmic protein	16	1
CNAG_02261	6	SE	hypothetical protein	9	1
CNAG_02351	6	SE	endochitinase	8	1
CNAG_02439	6	SE	hypothetical protein	8	2
CNAG_02527	6	SE	multidrug transporter	15	2
CNAG_02685	3	SE	hypothetical protein	6	1
CNAG_02742	3	SE	dicer-like protein 1	8	1
CNAG_02751*	3	SE	Short-chain dehydrogenase	9	1
CNAG_02771	3	SE	DNA repair and recombination protein RAD54B	25	1
CNAG_02789*	3	SE	nitrogen permease regulator 2	7	1

CNAG_02885	3	SE	capsular associated protein	9	1
CNAG_02950	3	SE	Grx4 family monothiol glutaredoxin	5	1
CNAG_02978	3	SE	hypothetical protein	5	1
CNAG_02986	3	SE	ADP-ribose pyrophosphatase	7	1
CNAG_03040	3	SE	transketolase	15	2
CNAG_03044	3	SE	hypothetical protein, variant	6	2
CNAG_03049	3	SE	hypothetical protein	6	1
CNAG_03065	3	SE	ER-derived vesicles protein ERV14	7	1
CNAG_03069	3	SE	hydrolase	8	1
CNAG_03134	8	SE	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	6	1
CNAG_03226	8	SE	succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial	9	1
CNAG_03281*	8	SE	glycine-rich RNA binding protein	13	3
CNAG_03321	8	SE	vacuolar protein sorting-associated protein 9	8	1
CNAG_03434	8	SE	solute carrier family 45, member 1/2/4	10	1

CNAG_03621	2	SE	Cyclophilin A	9	2
CNAG_03646	2	SE	phosphoribosylformimino-5-aminoimidazole carboxamide ribotide isomerase	6	1
CNAG_03666	2	SE	acyl-CoA dehydrogenase	13	1
CNAG_03713*	2	SE	efflux protein EncT	16	2
CNAG_03770	2	SE	hypothetical protein	4	1
CNAG_03782	2	SE	hypothetical protein	5	1
CNAG_03837	2	SE	protein-L-isoaspartate O-methyltransferase	8	1
CNAG_03958	2	SE	hypothetical protein	5	1
CNAG_04001	2	SE	20S proteasome subunit alpha 1	10	1
CNAG_04009	2	SE	aminopeptidase 2	8	1
CNAG_04030	2	SE	hypothetical protein	5	2
CNAG_04092	2	SE	Sugar transporter	11	1
CNAG_04120	9	SE	RNA polymerase II subunit A domain phosphatase	10	1
CNAG_04189	9	SE	succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	10	1

CNAG_04284	9	SE	hypothetical protein	8	1
CNAG_04314	9	SE	NAD kinase	7	2
CNAG_04320	9	SE	polysaccharide synthase Cps1p	7	1
CNAG_04408	9	SE	choline kinase	6	1
CNAG_04524	9	SE	zinc metalloprotease	7	1
CNAG_04659*	10	SE	Pyruvate decarboxylase	9	1
CNAG_04799	10	SE	large subunit ribosomal protein L14e	5	1
CNAG_04850	10	SE	hypothetical protein	17	2
CNAG_04869	10	SE	para-nitrobenzyl esterase	16	1
CNAG_04938	4	SE	hypothetical protein	8	2
CNAG_05026	4	SE	mango esterase	13	3
CNAG_05119	4	SE	GABA permease	14	1
CNAG_05146*	4	SE	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB9	5	1
CNAG_05201	4	SE	DNA mismatch repair protein Msh4	37	1

CNAG_05251	4	SE	hypothetical protein	4	1
CNAG_05273	4	SE	1,2-dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase	4	2
CNAG_05297	4	SE	hypothetical protein	3	1
CNAG_05344	14	SE	Hemolysin	9	1
CNAG_05386	14	SE	glutamate 5-kinase	13	2
CNAG_05387	14	SE	galactose transporter	11	1
CNAG_05533	14	SE	hypothetical protein	5	1
CNAG_05555*	14	SE	large subunit ribosomal protein L7Ae	6	1
CNAG_05578	14	SE	hypothetical protein	5	1
CNAG_05632	14	SE	hypothetical protein	4	1
CNAG_05644	14	SE	2-Nitropropane dioxygenase	11	1
CNAG_05719	7	SE	hypothetical protein	6	1
CNAG_05746	7	SE	Swi5-dependent recombination DNA repair protein 1	7	2
CNAG_05786	7	SE	hypothetical protein	7	2

CNAG_05820	7	SE	tryptophan aminotransferase	9	1
CNAG_05834	7	SE	hypothetical protein	23	2
CNAG_05851	7	SE	glycerol transporter	11	1
CNAG_05930	7	SE	hypothetical protein	15	1
CNAG_05997	12	SE	hypothetical protein	3	1
CNAG_06035	12	SE	Alcohol dehydrogenase	10	1
CNAG_06074*	12	SE	cytoplasmic protein	8	2
CNAG_06075	12	SE	hypothetical protein	5	1
CNAG_06148	12	SE	hypothetical protein	19	1
CNAG_06404	13	SE	hypothetical protein	3	1
CNAG_06419	13	SE	hypothetical protein	6	1
CNAG_06447	13	SE	Large subunit ribosomal protein L17, putative	6	1
CNAG_06501	13	SE	1,3-beta-glucanosyltransferase	12	1
CNAG_06605	7	SE	small subunit ribosomal protein S2	4	1

CNAG_06632	7	SE	Atypical/ABC1 protein kinase	11	1
CNAG_06646	7	SE	protein yop1	6	1
CNAG_06676	7	SE	hypothetical protein	7	1
CNAG_06685	7	SE	U2-associated protein SR140	12	1
CNAG_06794	2	SE	hypothetical protein	3	1
CNAG_06919	3	SE	rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin	5	1
CNAG_06926	3	SE	hypothetical protein	16	1
CNAG_07004	5	SE	dihydrolipoyl dehydrogenase	12	1
CNAG_07332	1	SE	hypothetical protein	11	2
CNAG_07405	5	SE	hypothetical protein	7	2
CNAG_07541*	3	SE	proteasome assembly chaperone 2	8	1
CNAG_07547*	3	SE	hypothetical protein	11	1
CNAG_07570	3	SE	prenylated SNARE protein Ykt6p	5	1
CNAG_07593	11	SE	hypothetical protein	11	1

CNAG_07638	6	SE	hypothetical protein	7	1
CNAG_07682	7	SE	hypothetical protein	16	2
CNAG_07830	4	SE	hypothetical protein	12	2
CNAG_07851	10	SE	isocitrate dehydrogenase, NAD-dependent	8	1
CNAG_08013	11	SE	hypothetical protein	13	1
CNAG_12354	4	SE	unspecified product	9	1
CNAG_12489	5	SE	unspecified product	4	1
CNAG_12516	6	SE	unspecified product	5	1
CNAG_13080	12	SE	unspecified product	3	1
CNAG_00016	1	SE	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm5	4	1
CNAG_00020	1	SE	hypothetical protein	11	1
CNAG_00046	1	SE	26S proteasome regulatory subunit N8	6	1
CNAG_00065	1	SE	ran-binding protein 1	7	1
CNAG_00130	1	SE	CAMK/CAMK1/CAMK1-RCK protein kinase	10	1

CNAG_00189	1	SE	hypothetical protein	7	1
CNAG_00251	1	SE	hypothetical protein	6	1
CNAG_00276	1	SE	hypothetical protein	6	1
CNAG_00383	1	SE	Aminophospholipid translocase, putative	25	1
CNAG_00498	1	SE	cell division cycle protein 14	8	1
CNAG_00522	1	SE	C2 domain-containing protein	9	2
CNAG_00584	1	SE	Profilin	6	1
CNAG_00597	1	SE	amino acid transporter	10	2
CNAG_00645	1	SE	2,5-diamino-6-(ribosylamino)-4(3H)-pyrimidinone 5'-phosphate reductase	5	1
CNAG_00710	1	SE	Glutamine synthetase	13	1
CNAG_00716	1	SE	Cytoome c	7	1
CNAG_00806	1	SE	hypothetical protein	4	1
CNAG_00877	5	SE	Adenylate kinase	11	2
CNAG_00909	5	SE	phosphopantothenoylcysteine decarboxylase	6	1

CNAG_00970	5	SE	phosphatidate cytidyltransferase	12	1
CNAG_00984	5	SE	glucose and ribitol dehydrogenase	7	1
CNAG_00990	5	SE	F-type H -transporting ATPase subunit H	6	2
CNAG_01048	5	SE	hypothetical protein	15	2
CNAG_01137	5	SE	aconitate hydratase, mitochondrial	8	1
CNAG_01150	5	SE	omega-6 fatty acid desaturase (delta-12 desaturase)	6	1
CNAG_01212	5	SE	hypothetical protein	9	1
CNAG_01291	5	SE	hypothetical protein	4	1
CNAG_01300	5	SE	small subunit ribosomal protein S21e	6	1
CNAG_01557	11	SE	Calmodulin	10	1
CNAG_01558	11	SE	chlorophyll synthesis pathway protein BchC	6	1
CNAG_01619	11	SE	hypothetical protein	14	1
CNAG_01745	11	SE	glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD())	5	1
CNAG_01811	11	SE	hypothetical protein	8	1

CNAG_01952	11	SE	aryl-alcohol dehydrogenase	16	2
CNAG_01961	11	SE	MSP domain-containing protein	5	1
CNAG_02133	6	SE	6-phosphogluconolactonase	3	1
CNAG_02164	6	SE	hypothetical protein	5	1
CNAG_02200	6	SE	hypothetical protein	4	1
CNAG_02254	6	SE	quininate permease	11	1
CNAG_02359	6	SE	small subunit ribosomal protein S25e	4	1
CNAG_02360	6	SE	hypothetical protein	5	1
CNAG_02400	6	SE	hypothetical protein	7	1
CNAG_02545	6	SE	Inorganic pyrophosphatase	8	1
CNAG_02546	6	SE	transferase	5	1
CNAG_02562	3	SE	acyl-CoA dehydrogenase	18	1
CNAG_02575	3	SE	Rab small monomeric GTPase	6	1
CNAG_02753	3	SE	endoplasmic reticulum protein	6	1

CNAG_02991	3	SE	Cofilin	6	1
CNAG_03019	3	SE	long-chain acyl-CoA synthetase	17	1
CNAG_03086*	8	SE	hypothetical protein	8	2
CNAG_03100	8	SE	cytoplasmic protein	14	1
CNAG_03110	8	SE	hypothetical protein	8	1
CNAG_03114	8	SE	hypothetical protein	3	1
CNAG_03128	8	SE	gamma-glutamyltransferase	13	2
CNAG_03153	8	SE	SEC14 cytosolic factor	6	2
CNAG_03198	8	SE	small subunit ribosomal protein S8e	6	1
CNAG_03243	8	SE	2-Nitropropane dioxygenase	12	1
CNAG_03270	8	SE	Adenylosuccinate lyase	11	1
CNAG_03355	8	SE	Two-component-like sensor kinase	43	1
CNAG_03465	8	SE	laccase	19	1
CNAG_03566	8	SE	hypothetical protein	5	1

CNAG_03695	2	SE	capsule biosynthetic protein	16	1
CNAG_03719	2	SE	Putative transporter of the major facilitator superfamily (MFS)	13	1
CNAG_03821	2	SE	phosphatidylinositol 3-kinase	14	1
CNAG_03844*	2	SE	nonselective cation channel protein	17	1
CNAG_03888	2	SE	hypothetical protein	15	1
CNAG_04098	2	SE	ATP-binding cassette, subfamily G (WHITE), member 2, PDR	20	1
CNAG_04154	9	SE	hypothetical protein	4	1
CNAG_04194	9	SE	protein transporter SEC13	7	1
CNAG_04291	9	SE	glycosyl-hydrolase	8	1
CNAG_04654	10	SE	UNC-50 family protein	7	1
CNAG_04656	10	SE	arginine-tRNA-protein transferase	9	2
CNAG_04667	10	SE	hypothetical protein	3	1
CNAG_04735	10	SE	extracellular elastinolytic metalloproteinase	6	1
CNAG_04814	10	SE	hypothetical protein	4	1

CNAG_04821*	10	SE	PAB-dependent poly(A)-specific ribonuclease subunit PAN3	9	1
CNAG_04867	10	SE	vacuolar protein	6	1
CNAG_04883	10	SE	small subunit ribosomal protein S18	4	1
CNAG_04953	4	SE	hypothetical protein	5	1
CNAG_05013	4	SE	RNP domain-containing protein	9	1
CNAG_05095	4	SE	pod-specific dehydrogenase SAC25	7	1
CNAG_05137	4	SE	ER lumen protein retaining receptor	4	1
CNAG_05167	4	SE	hypothetical protein	3	1
CNAG_05190	4	SE	hypothetical protein	7	1
CNAG_05193	4	SE	endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment protein 2	9	1
CNAG_05218	4	SE	adenylyl cyclase-associated protein	9	1
CNAG_05264	4	SE	alpha-amylase AmyA	10	2
CNAG_05313	4	SE	hypothetical protein	25	5
CNAG_05352	14	SE	acetyl-CoA transporter	7	1

CNAG_05380	14	SE	hypothetical protein	15	1
CNAG_05389	14	SE	sphinganine-1-phosphate aldolase	12	1
CNAG_05424*	14	SE	hypothetical protein	6	1
CNAG_05479	14	SE	Fungal specific transcription factor, putative	21	2
CNAG_05518	14	SE	exocyst complex component 4	14	1
CNAG_05637	14	SE	hypothetical protein	5	1
CNAG_05653	14	SE	malate synthase A	8	1
CNAG_05664	14	SE	Branched-chain-amino-acid transaminase	6	1
CNAG_05734	7	SE	cell wall organization and biogenesis-related protein, putative	10	2
CNAG_05918	7	SE	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	6	1
CNAG_05938	7	SE	hypothetical protein	8	1
CNAG_05994*	12	SE	multidrug transporter	13	1
CNAG_06109*	12	SE	hypothetical protein	6	2
CNAG_06113	12	SE	hypothetical protein	5	1

CNAG_06240	12	SE	protein disulfide-isomerase	9	1
CNAG_06333	13	SE	replication factor C subunit 3/5	12	2
CNAG_06420	13	SE	solute carrier family 25 (mitochondrial citrate transporter), member 1	8	1
CNAG_06432	13	SE	Acetate kinase	8	1
CNAG_06438	13	SE	hypothetical protein	11	1
CNAG_06531	7	SE	hypothetical protein	11	2
CNAG_06647	7	SE	hypothetical protein	5	1
CNAG_06666	7	SE	starch phosphorylase	21	1
CNAG_06728	2	SE	kinesin	14	1
CNAG_06737*	2	SE	vacuolar protein sorting-associated protein	14	2
CNAG_06862*	5	SE	vacuolar protein	8	3
CNAG_06871	5	SE	hypothetical protein	10	1
CNAG_06888	3	SE	cytoplasmic protein	10	1
CNAG_06920	3	SE	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 10	5	1

CNAG_06946	5	SE	hypothetical protein	9	1
CNAG_07011	12	SE	hypothetical protein	21	2
CNAG_07368	1	SE	calcium activated cation channel protein	19	1
CNAG_07403	5	SE	Peroxisomal ATPase PEX1	15	1
CNAG_07456	5	SE	hypothetical protein	9	2
CNAG_07481	2	SE	hypothetical protein	8	1
CNAG_07740	8	SE	hypothetical protein	6	1
CNAG_07741	8	SE	cytoplasmic protein	13	1
CNAG_07758	9	SE	hypothetical protein	32	1
CNAG_08008*	11	SE	hypothetical protein	24	1
CNAG_12629	7	SE	unspecified product	7	1
CNAG_12726	8	SE	unspecified product	5	1
CNAG_13043	11	SE	unspecified product	8	1

*Gene apresentou mais de um transcrito sofrendo o tipo de AS correspondente.