



Instituto de Ciências Biológicas

Universidade de Brasília

Departamento de Biologia Molecular

# Análise Computacional da expressão Gênica em modelo *in vitro* de Cromoblastomicose

Autor: Carlos Daniel Moreira Duarte

Orientador: Georgios Joannis Pappas Junio

# Sumário

<b>1. Introdução</b>	<b>2</b>
<b>2. Metodologia</b>	<b>3</b>
2.1. Obtenção das amostras e preparo para RNA-seq	3
2.2. Processamento inicial dos dados de RNA-seq	5
2.3. Utilização de pipelines em Nextflow/nf-core	5
2.4. Instalação da pipeline	5
2.5. Infraestrutura computacional	5
<b>3. Resultados</b>	<b>6</b>
3.1. Execução da pipeline nf-core/rnaseq	6
3.2. Pipeline executada com sucesso	7
3.3. Análise de qualidade dos FASTQs	8
3.4. Análise de expressão diferencial	9
<b>4. Conclusões</b>	<b>15</b>
<b>5. Bibliografia</b>	<b>15</b>
<b>6. Anexos</b>	<b>16</b>

# 1. Introdução

A cromoblastomicose (CBM) é uma micose crônica, granulomatosa e de difícil tratamento, causada principalmente por *Fonsecaea pedrosoi* (Brito & Bittencourt, 2018; Queiroz-Telles et al., 2017). A doença apresenta alta incidência em regiões tropicais e subtropicais, incluindo o Brasil, onde se destaca como um problema de saúde pública negligenciado (Santos et al., 2021; de Andrade et al., 2020). O insucesso terapêutico está relacionado ao caráter recalcitrante da infecção, frequentemente atribuído à diferenciação das formas fúngicas em células muriformes (CMs), também chamadas corpos escleróticos, que representam a principal forma patogênica (Salgado et al., 2004; Santos et al., 2007; Gajurel et al., 2023). Essas células são altamente melanizadas, possuem parede celular espessa e apresentam maior resistência à resposta imune e aos antifúngicos convencionais, o que contribui para a persistência e cronicidade da doença (Ameen, 2009).

O presente projeto busca compreender os mecanismos moleculares envolvidos na diferenciação para a forma muriforme e na interação de *F. pedrosoi* com macrófagos, visando identificar genes diferencialmente expressos que possam representar potenciais alvos terapêuticos. Para isso, serão utilizados dados de RNA-seq obtidos de conídios e células induzidas à diferenciação em CMs, expostos ou não à interação com macrófagos. Essa abordagem possibilita uma análise global da expressão gênica, fornecendo informações quantitativas e qualitativas sobre a resposta transcricional do fungo (Stark et al., 2019).

A técnica de RNA-seq permite uma análise global da expressão de mRNAs através do sequenciamento do DNA complementar (cDNA) usando as novas tecnologias de sequenciamento de DNA, em particular a plataforma Illumina (Li Song et al., 2015). Esta técnica foi bastante difundida na última década e a sua utilização permite obter um nível de resolução do perfil de expressão de RNAs no processo de diferenciação celular em *F. pedrosoi*.

Considerando o grande volume e a complexidade desses dados, serão aplicados pipelines de bioinformática desenvolvidos em Nextflow (Di Tommaso et al., 2017), uma plataforma que organiza análises em fluxos de trabalho escaláveis e reproduzíveis. Em particular, foi utilizado o pipeline nf-core/rnaseq (Patel et al., 2024), que permite a realização de uma análise completa de dados de RNA-seq, desde o pré-processamento das leituras até a análise diferencial de expressão e enriquecimento funcional de genes.

Ao integrar dados experimentais de RNA-seq com pipelines otimizados em Nextflow/nf-core, este projeto pretende contribuir para o entendimento da biologia de *F. pedrosoi* e dos mecanismos que sustentam sua resistência, oferecendo subsídios para o desenvolvimento de novas estratégias farmacêuticas no enfrentamento da cromoblastomicose.

## 2. Metodologia

### 2.1. Obtenção das amostras e preparo para RNA-seq

O material biológico foi disponibilizado para análise pelo Laboratório vinculado ao projeto de pesquisa intitulado “Enfrentando a Cromoblastomicose: do entendimento do papel das células muriformes ao desenvolvimento de novas estratégias farmacêuticas para tratar a doença”, aprovado no Edital nº 09/2023 da Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF), conforme publicação no Diário Oficial do Distrito Federal, nº 202, de 27/10/2023, página 69. O projeto é coordenado pela professora Larissa Fernandes Matos, da Universidade de Brasília – Faculdade de Ceilândia.

A extração de RNA mensageiro (mRNA) de amostras comparando o estado de diferenciação celular entre células normais e células muriformes foi realizada no laboratório da Prof.<sup>a</sup> Larissa Fernandes Matos, sendo que foram obtidas quatro réplicas biológicas para cada tipo de célula. As amostras de mRNA foram enviadas para o sequenciamento para o Centro de Genômica Funcional (ESALQ-USP), utilizando a tecnologia Illumina na configuração *paired-end* 2x150 bases. Após o sequenciamento, foram obtidos dados brutos de sequência no formato padrão (FASTQ).

Os dados obtidos foram distribuídos da seguinte forma:

<b>Amostra</b>	<b>R1 (bytes)</b>	<b>R2 (bytes)</b>	<b>Total (bytes)</b>	<b>Morfologia</b>
CMT1	1.1 G	1.1 G	2.2 G	Célula muriforme
CMC1	917 M	910 M	1,827 M	Micélio
CMT2	923 M	912 M	1,835 M	Célula muriforme
CMC2	733 M	727 M	1,460 M	Micélio
CMT3	857 M	849 M	1,706 M	Célula muriforme
CMT3	808 M	802 M	1,610 M	Micélio

CMT4	877 M	869 M	1,746 M	Célula muriforme
CMC4	885 M	878 M	1,763 M	Micélio

## 2.2. Processamento inicial dos dados de RNA-seq

As sequências brutas (arquivos FASTQ) foram submetidas a controle de qualidade utilizando os programas FastQC e MultiQC, os quais geram relatórios detalhados para aferir a qualidade global dos dados de sequenciamento. Adicionalmente, procedeu-se com a remoção de adaptadores e leituras de baixa qualidade via o programa Trim\_Galore, versão 0.6.10, permitindo a remoção de artefatos de sequenciamento.

## 2.3. Utilização de pipelines em Nextflow/nf-core

Para análise dos dados, foram empregados pipelines desenvolvidos na linguagem especializada denominada Nextflow (Di Tommaso et al., 2017). Esta linguagem permite a integração modular de diferentes etapas de bioinformática em fluxos de trabalho reprodutíveis. Em particular, foi utilizada a pipeline do nf-core/rnaseq (Patel et al., 2024), a qual é amplamente utilizada e validada para análises de RNA-seq. Com esta é possível realizar o controle de qualidade global, mapeamento das leituras contra o genoma de referência, reconstrução e quantificação de transcritos e análises estatísticas para identificar genes diferencialmente expressos.

## 2.4. Instalação da pipeline

Para garantir o isolamento de dependências e a organização do sistema, foi criado um ambiente Mamba versão 1.5.9 dedicado à execução do Nextflow versão 25.04.2.5947 utilizando versões específicas das ferramentas conforme necessário. A utilização de ambientes isolados constitui uma prática recomendada em bioinformática, assegurando o controle rigoroso das versões dos softwares empregados e garantindo a reprodutibilidade das análises. Com o ambiente Mamba ativo, a instalação do Nextflow foi realizada utilizando os canais oficiais bioMamba e Mamba-forge, sendo a instalação validada pelo comando `nextflow -version`.

A execução dos pipelines foi realizada em servidores Linux com suporte à virtualização via a plataforma [Docker](#) versão 20.10.5+dfsg1, assegurando reprodutibilidade das análises e portabilidade dos resultados.

## 2.5. Infraestrutura computacional

As análises foram conduzidas no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília, que dispõe de dois servidores multiprocessados Intel Xeon® (24 núcleos cada, 128 GB de RAM) e storage arrays com 12 TB de armazenamento. Além disso, foram utilizadas estações de trabalho Linux (Ubuntu 22.04) com suporte para execução de contêineres Docker e Singularity.

## 3. Resultados

Os dados brutos de sequências obtidos do experimento de RNA-seq contrastam o perfil de expressão de mRNAs de células normais de *F. pedrosoi* com células muriformes. A quantidade de dados brutos foi de aproximadamente 13,37 GB indicando a necessidade de um amplo processamento computacional para obtermos a resposta para as seguintes perguntas:

- Existe diferença na expressão de mRNAs entre os dois tipos celulares estudados?
- Se sim, quais os mRNAs mais expressos em cada tipo celular? Da mesma maneira, quais mRNAs tiveram sua expressão reprimida?
- Podemos encontrar utilizar os dados de expressão para compreender o processo de diferenciação celular em *F. pedrosoi*?

Este projeto consistiu no estudo das técnicas de processamento de dados de RNA-seq e na instalação e execução de protocolos computacionais que implementam todas as etapas analíticas deste processo, começando pelos dados brutos até a descoberta dos genes diferencialmente expressos entre as condições testadas.

### 3.1. Execução da pipeline nf-core/rnaseq

Durante o período do estágio, foram realizadas tentativas de execução da pipeline nf-core/rnaseq. Inicialmente, não foi possível executar a pipeline diretamente pelo nf-core devido a erros relacionados a permissões e incompatibilidades de versão. Diversas abordagens foram testadas, incluindo alterações de permissão em diretórios de execução utilizando o comando `chmod +x`, mas sem sucesso.

Foi identificado que as versões 3.18.0, 3.17.0, 3.14.1 e 3.16.1 da pipeline apresentavam bugs conhecidos ao executar os perfis:

---

-profile test

-profile test\_full

---

Segundo relatos de usuários no [GitHub](#), apenas algumas versões mais recentes da pipeline estavam funcionando corretamente. Tentativas de execução utilizando versões anteriores ou intermediárias não tiveram sucesso.

## 3.2. Pipeline executada com sucesso

Após atualização recente, a pipeline nf-core/rnaseq versão 3.20.0 foi baixada diretamente do GitHub como arquivo .zip e executada com sucesso. Com esta abordagem, foi possível gerar as tabelas de quantificação de transcritos, disponíveis na pasta: PIBIC-AF 24/25, em anexo. O arquivo principal resultante foi: salmon.merged.gene\_counts\_length\_scaled.tsv

Esses dados foram incorporados ao relatório, e, foram utilizados para gerar gráficos de expressão gênica, como gráficos de barras e vulcão, no R. Ressalta-se que a execução bem-sucedida só foi possível com a versão 3.20.0 da pipeline.

- `wget https://github.com/nf-core/rnaseq/archive/refs/tags/3.20.0.zip`

Após o download, foi realizada a descompactação do arquivo e navegação até o diretório da pipeline:

- `cd rnaseq-3.20.0`

Para executar a pipeline, é necessário criar um arquivo de entrada samplesheet.csv contendo informações sobre os tratamentos e amostras utilizadas.

A linha de comando utilizada para rodar a pipeline foi:

---

```
nextflow run main.nf \

--input /array1/COMPGEN/LARISSA/RNA_SEQ/DANIEL/data/samplesheet.csv \

--outdir ./rna-seq_results \

--gtf
/array1/COMPGEN/LARISSA/RNA_SEQ/DANIEL/data/genome/ncbi_dataset/data/GCF_000835455.1/genomic.g
tf \

--fasta
/array1/COMPGEN/LARISSA/RNA_SEQ/DANIEL/data/genome/ncbi_dataset/data/GCF_000835455.1/GCF_0008
35455.1_Fons_pedr_CBS_271_37_V1_genomic.fna \

-profile docker
```

---

Esta execução gerou os resultados de quantificação de transcritos, que foram salvos na pasta `rna-seq_results` para posterior análise diferencial e geração de gráficos.

### 3.3. Análise de qualidade dos FASTQs

A qualidade dos arquivos FASTQ foi avaliada utilizando FASTQC. Os resultados indicaram boa qualidade geral, com distribuição uniforme de bases, baixo nível de contaminação e ausência significativa de adaptadores. O programa MultiQC foi utilizado para agregar os resultados prévios para gerar os relatórios gráficos abaixo.

A avaliação do gráfico de qualidades das leituras (Figura 1) demonstra um perfil de qualidade excelente. Observa-se uma predominância absoluta de escores na faixa de Q30 (taxa de erro 0,01%) e superiores (tons de verde intenso) ao longo de todas as posições das leituras para a totalidade das amostras analisadas. Não há evidência de degradação da qualidade nas regiões iniciais ou terminais das sequências, indicando uma performance ótima e estável da química de sequenciamento. A uniformidade entre as amostras é completa, sem a presença de outliers, o que atesta a robustez do processo de preparação das bibliotecas e da execução da corrida. Os dados apresentam integridade superior e são mais do que adequados para análises posteriores.

A inspeção do Gráfico de histograma (Figura 2) "Inside the Squares Quality Score" revela um perfil de qualidade decrescente, padrão comum em tecnologias de sequenciamento por síntese. As regiões iniciais das Leituras (aproximadamente até a posição 90) apresentam escores elevados (Q>30, verde), indicando alta confiabilidade. No entanto, a partir dessa



posição, observa-se uma degradação gradual e consistente da qualidade em todas as amostras, com uma transição para escores na faixa de Q20-Q25 (tons de amarelo e laranja) nas posições finais. Apesar do declínio, a qualidade mantém-se em níveis aceitáveis ( $Q > 20$ ) para a maioria das amostras, não sendo identificadas regiões com escores críticos (vermelho). A consistência do padrão entre as amostras indica que o fenômeno é sistemático e não atribuível a falhas individuais. Recomenda-se a aplicação de trimming brando das extremidades 3' para otimizar a qualidade geral dos dados para análises subsequentes.

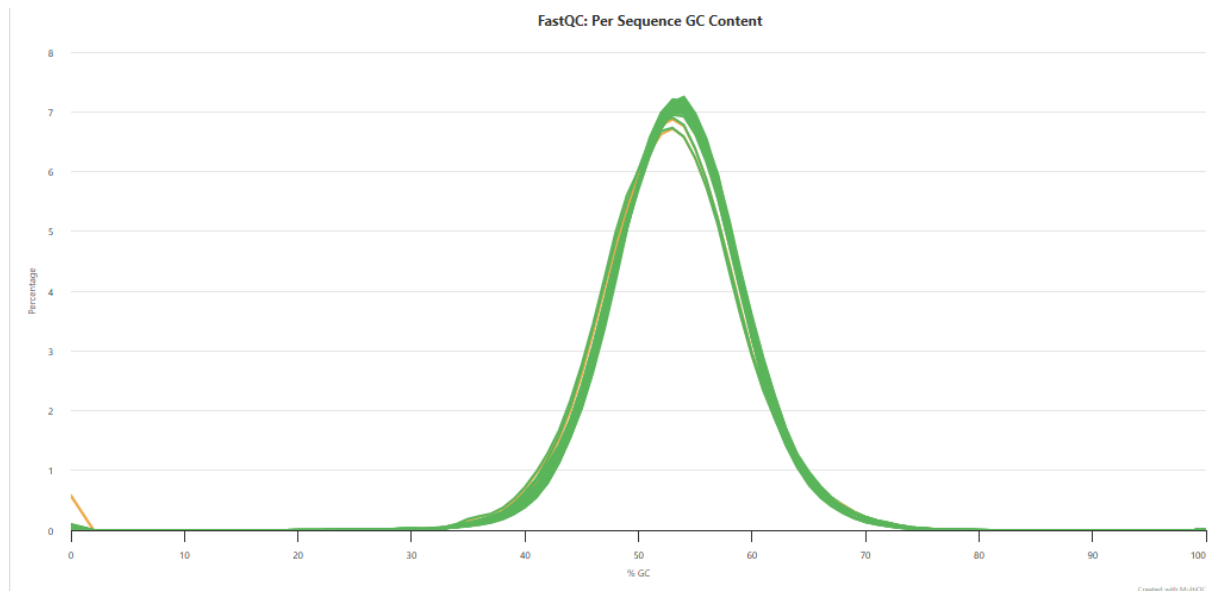


Figura 1 - Análise da porcentagem de bases G e C

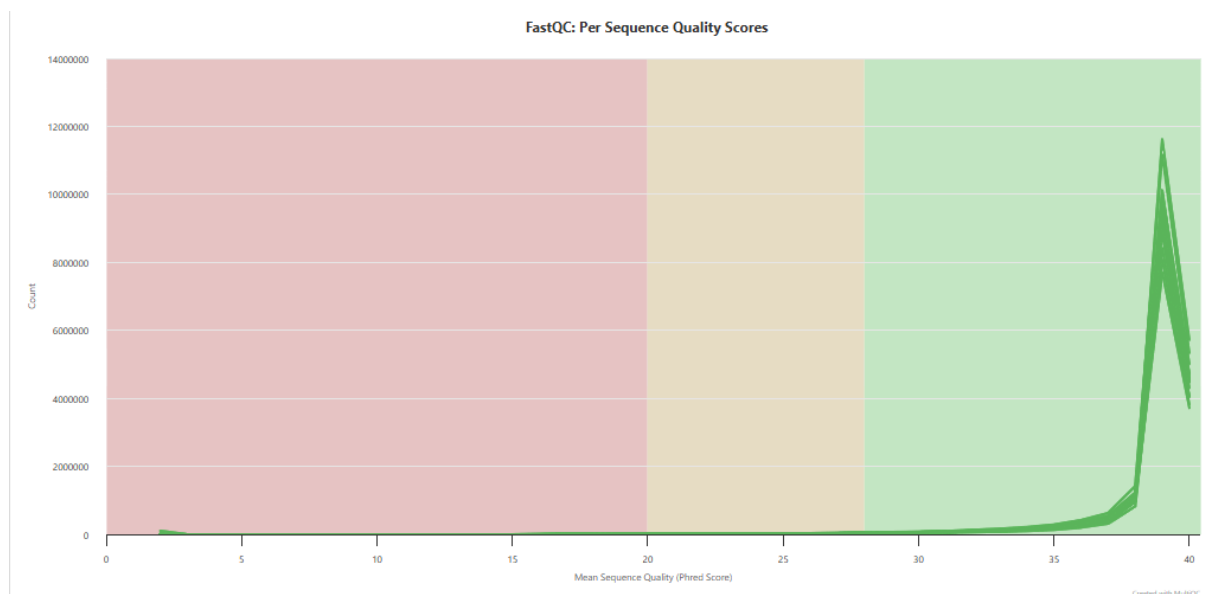


Figura 2: Perfil de escores de qualidade de sequenciamento para todas as amostras sequenciadas. Os valores do eixo X correspondem ao escore de qualidade, que representa a taxa de erro. Por exemplo, o valor de 20 ( $Q=20$ ) representa uma probabilidade de erro de  $10^{-2}$  ou 1%.

### 3.4. Análise de expressão diferencial

Com os dados gerados, foram realizadas análises estatísticas para a descoberta de transcritos diferencialmente expressos entre as condições de células muriformes (CM) induzidas e o controle (CT). Esta análise busca identificar os genes que foram mais expressos (*upregulated*) em CM comparado com CT, e ao mesmo tempo os genes que sofreram diminuição de expressão significativa em CM (*downregulated*).

Os resultados estão disponíveis no notebook Colab:

[Notebook Colab](#)<sup>1</sup>

Os gráficos representam a expressão diferencial de genes entre as condições estudadas, destacando genes significativamente regulados. Cada gráfico foi analisado detalhadamente para interpretação biológica.

---

<sup>1</sup> <https://colab.research.google.com/drive/18HhxsrjZH6liQh1liZgZTofducfJd-fB?usp=sharing>

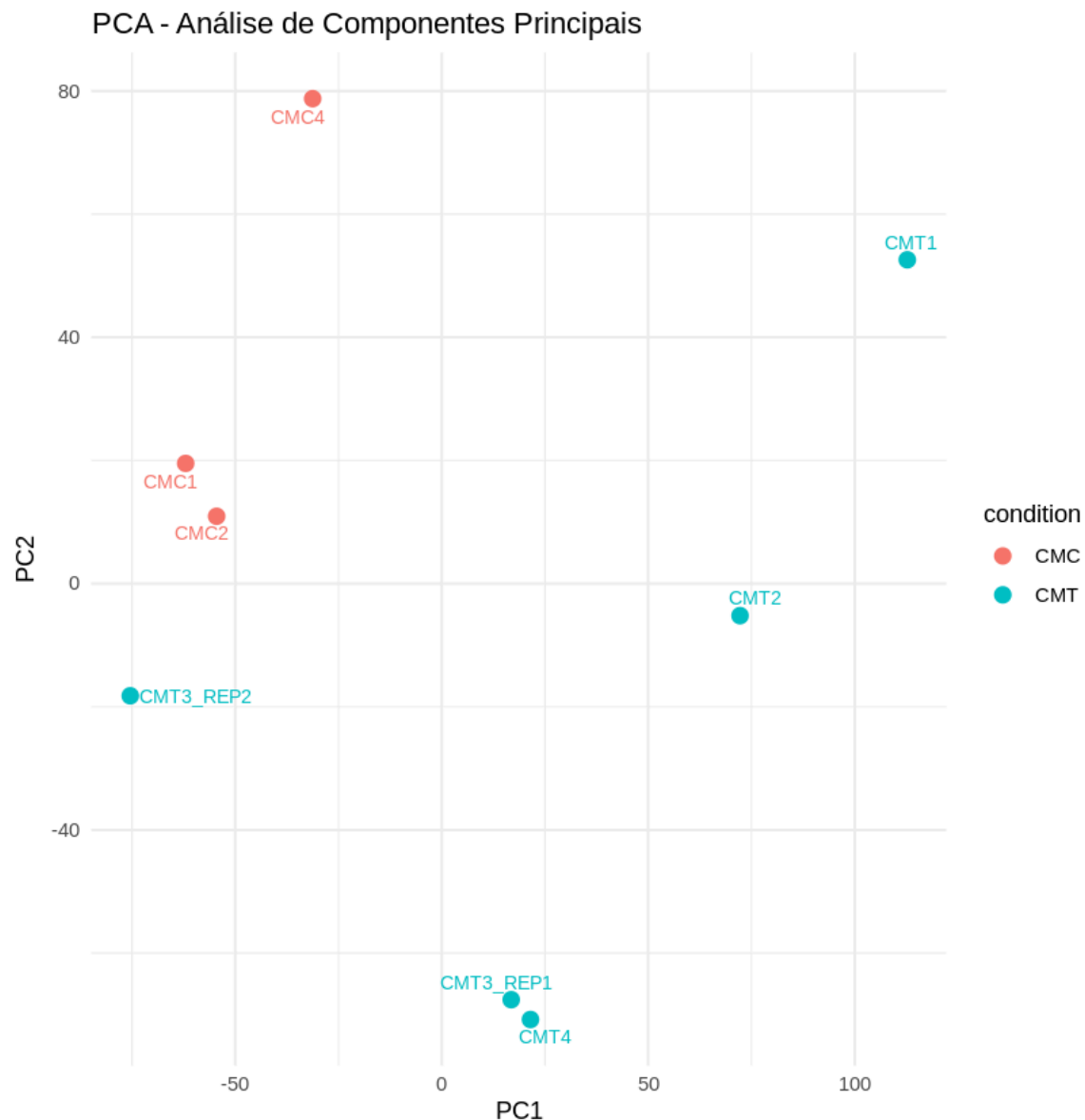


Figura 3: Análise de componentes principais (PCA)

A Figura 3 demonstrou que as amostras de micélio e de células muriformes de *Fonsecaea pedrosoi* apresentam perfis de expressão gênica claramente distintos, formando dois agrupamentos bem definidos. Esse resultado confirma que a variação transcricional observada é fortemente dependente do estado celular, o que sugere que a transição morfológica de micélio para célula muriforme está associada a uma ampla remodelação do transcriptoma. A proximidade entre as réplicas biológicas dentro de cada condição indica consistência e robustez experimental, reduzindo a possibilidade de que as diferenças detectadas sejam decorrentes de ruído técnico ou variação individual.

Cabe ressaltar que a amostra originalmente identificada como CMT3\_REP2 na verdade corresponde a uma amostra controle, como evidenciado tanto pelo agrupamento no PCA

quanto pelo padrão observado no heatmap. Portanto, essa amostra deveria ser corretamente denominada CMC3.

Do ponto de vista biológico, a separação entre os grupos sugere que genes específicos são ativados ou reprimidos de maneira coordenada durante a diferenciação celular. Esse fenômeno é consistente com estudos anteriores em fungos patogênicos dimórficos, nos quais a mudança morfológica está intimamente ligada à adaptação ao ambiente do hospedeiro e ao estabelecimento da infecção. No caso de *F. pedrosoi*, a formação de células muriformes é considerada um marcador morfológico da cromoblastomicose e está associada à persistência do fungo nos tecidos humanos. A distinção clara entre os perfis transcricionais sugere, portanto, que essa morfologia não é apenas uma adaptação estrutural, mas também reflete uma reorganização funcional profunda em termos de expressão gênica.

Além disso, a PCA evidencia que as células muriformes apresentam um padrão transcricional singular, que pode estar relacionado a mecanismos de resistência às defesas do hospedeiro, maior capacidade de sobrevivência em ambientes adversos e alteração de vias metabólicas. Por outro lado, os perfis de micélio mostram maior homogeneidade e parecem refletir um estado voltado para crescimento vegetativo. Essa dicotomia é fundamental para compreender o ciclo de vida do fungo e reforça a importância da expressão gênica diferencial na regulação de fenótipos adaptativos.

Assim, os resultados da PCA não apenas confirmam a existência de diferenças transcricionais robustas entre micélio e células muriformes, mas também fornecem evidências de que a transição morfológica em *F. pedrosoi* representa um processo complexo de reprogramação gênica, potencialmente associado à patogenicidade, à persistência no hospedeiro e à capacidade do fungo em modular seu metabolismo e sua resposta ao estresse.

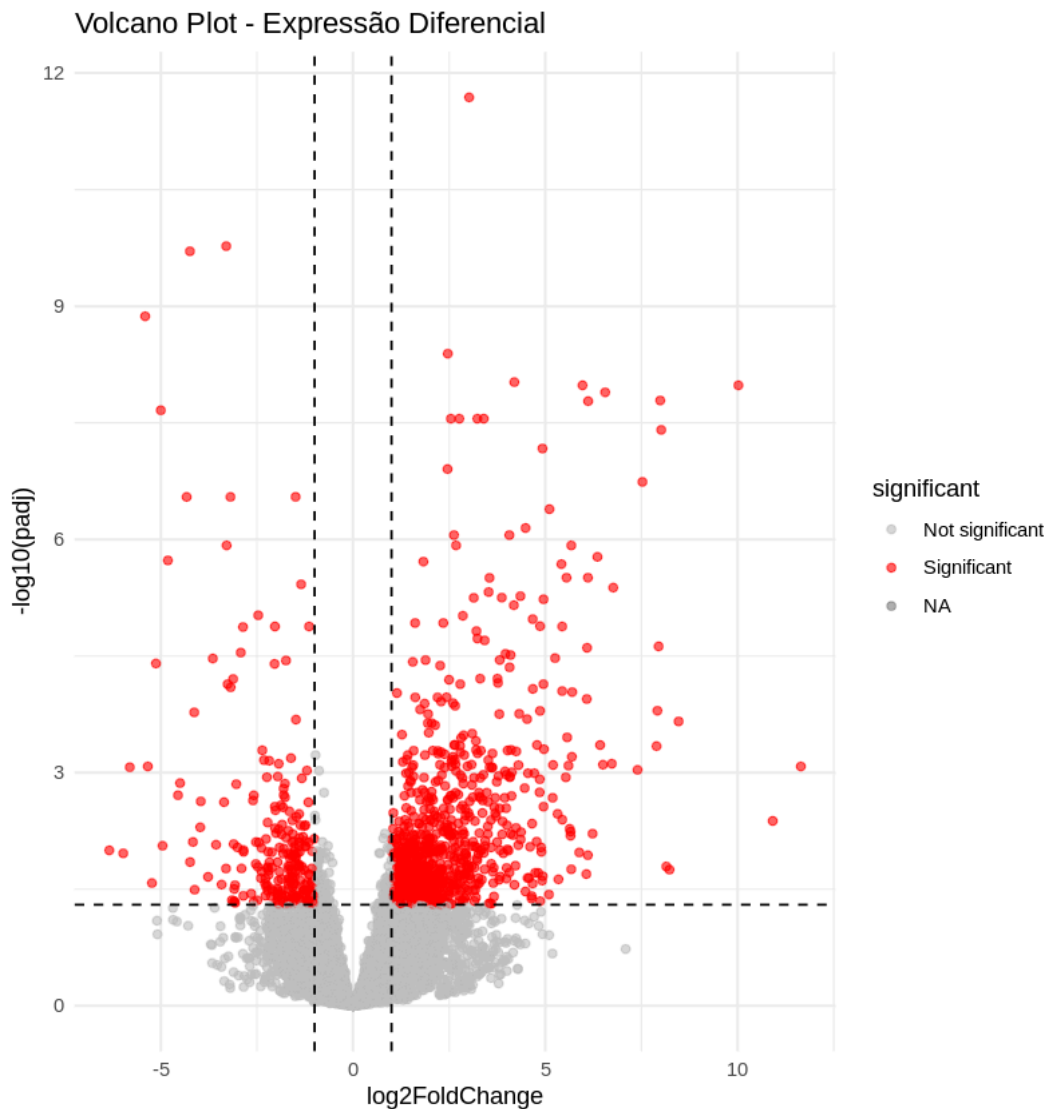


Figura 4: Análise de expressão diferencial por representada por Volcano Plot

A Figura 4 revelou um número expressivo de genes significativamente regulados entre micélio e células muriformes de *Fonsecaea pedrosoi*. O gráfico mostra uma ampla distribuição de genes com variações positivas e negativas no  $\log_2\text{FoldChange}$ , o que indica que a transição morfológica é acompanhada tanto pela ativação quanto pela repressão de conjuntos específicos de genes. A presença de numerosos pontos vermelhos nas duas extremidades demonstra que a mudança de micélio para célula muriforme envolve um processo de reprogramação transcricional de larga escala, refletindo adaptações complexas ao novo estado celular.

Genes localizados no lado positivo do eixo X correspondem àqueles mais expressos em células muriformes, sugerindo a ativação de vias associadas à sobrevivência em condições de estresse, resistência às defesas do hospedeiro e adaptação metabólica a ambientes hostis. Por outro lado, os genes situados no lado negativo estão reprimidos nas células muriformes e apresentam maior expressão em micélio, possivelmente relacionados a

processos de crescimento vegetativo, divisão celular e expansão filamentosa, características do estado micelial.

A robustez dos resultados é reforçada pelo elevado número de genes que ultrapassa o limiar de significância estatística, evidenciado pela concentração de pontos acima da linha de corte no eixo y. Isso confirma que as diferenças observadas não são aleatórias, mas refletem mudanças consistentes e biologicamente relevantes. Tais alterações provavelmente incluem genes ligados à parede celular, que em células muriformes apresentam espessamento e melanização, além de genes envolvidos em respostas ao estresse oxidativo e processos metabólicos adaptativos.

Esses achados estão de acordo com estudos prévios em fungos dimórficos patogênicos, nos quais a mudança de morfologia implica um reposicionamento estratégico do metabolismo e da expressão gênica para favorecer a sobrevivência no hospedeiro. No contexto da cromoblastomicose, a expressão diferencial identificada aqui sugere que a morfogênese muriforme de *F. pedrosoi* não apenas representa uma mudança estrutural, mas também corresponde a uma reorganização funcional profunda, que pode estar diretamente associada à sua virulência e persistência crônica nos tecidos humanos.

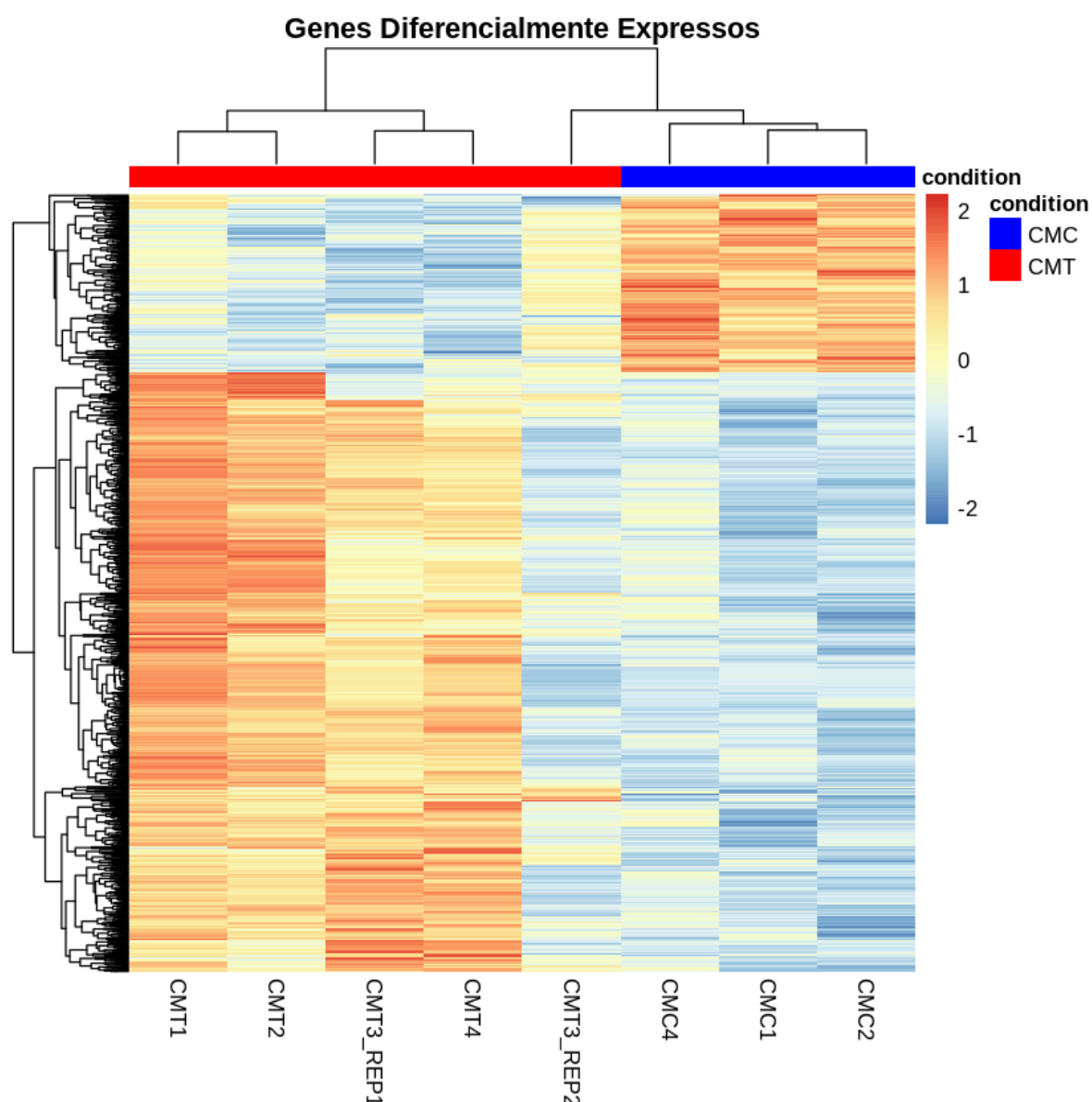


Figura 5: Análise de expressão diferencial por representada por Heatmap

A Figura 5 evidencia de forma clara a separação entre micélio (CMC) e células muriformes (CMT), confirmando que a transição morfológica em *Fonsecaea pedrosoi* é acompanhada por mudanças expressivas no perfil transcricional. As amostras se agruparam de acordo com sua condição biológica, com CMT apresentando um padrão distinto de CMC, o que reforça a robustez dos dados e a consistência das réplicas biológicas. Esse agrupamento indica que os genes diferencialmente expressos são fortemente influenciados pela morfologia, sugerindo a existência de programas regulatórios específicos que direcionam a adaptação fúngica em cada estado.

Os genes mais fortemente expressos em CMT, representados pelas tonalidades em vermelho, refletem a ativação de mecanismos associados à sobrevivência em condições adversas, incluindo modificações na parede celular, aumento de resistência a estresses

ambientais e processos ligados à virulência. Por outro lado, os genes mais abundantes em micélio (CMC), marcados em tons de azul, provavelmente estão relacionados a processos de crescimento filamentoso, expansão vegetativa e funções metabólicas típicas da forma saprofítica.

Além disso, a organização hierárquica dos clusters revela grupos bem definidos de genes que compartilham padrões de coexpressão. Isso sugere que a regulação transcricional não ocorre de maneira isolada, mas sim em módulos funcionais que podem estar associados a vias metabólicas ou de sinalização específicas. Assim, é possível que determinadas vias sejam ativadas em células muriformes para aumentar sua capacidade de adaptação ao hospedeiro, enquanto outras sejam reprimidas em relação ao micélio, refletindo a redução de processos voltados ao crescimento vegetativo.

## 4. Conclusões

Com base na análise dos dados de RNA-seq, foi possível concluir que a qualidade das sequências obtidas é excelente, conforme evidenciado pelo perfil consistente de escores de qualidade superiores a Q30 em todas as posições das reads e amostras, sem indícios de degradação significativa. A robustez dos dados permitiu a aplicação do pipeline nf-core/rnaseq para processamento, alinhamento e quantificação da expressão gênica, gerando resultados confiáveis e reprodutíveis. A análise diferencial revelou um número significativo de genes regulados entre micélio e células muriformes de *Fonsecaea pedrosoi*, com padrões transcricionais distintos e consistentes entre réplicas biológicas, validados por técnicas de agrupamento (PCA e heatmap) e análise estatística (Volcano Plot). Esses resultados indicam que a transição morfológica está associada a uma reprogramação gênica em larga escala, envolvendo genes relacionados à resistência a estresses, adaptação metabólica e virulência. A expertise adquirida na aplicação de pipelines de bioinformática para RNA-seq é transferível para outros projetos de transcriptômica, dada a natureza modular e genérica das ferramentas utilizadas. Os achados deste estudo fornecem insights fundamentais sobre os mecanismos moleculares subjacentes à diferenciação celular em *F. pedrosoi* e representam um ponto de partida para validações experimentais *in vitro* e *in vivo*, com potencial para identificar alvos terapêuticos inovadores contra a cromoblastomicose.

## 5. Bibliografia

1. Brito AC, Bittencourt MJS. Chromoblastomycosis: an etiological, epidemiological, clinical, diagnostic, and treatment update. *An Bras Dermatol*. 2018;93(4):495-506.
2. Queiroz-Telles F, et al. Chromoblastomycosis. *Clin Microbiol Rev*. 2017;30(1):233-76.



3. Santos DWCL, et al. The global burden of chromoblastomycosis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021;15(8):e0009611.
4. de Andrade TS, et al. Chromoblastomycosis in the Amazon region, Brazil, caused by *Fonsecaea pedrosoi*, *Fonsecaea nubica*, and *Rhinocladiella similis*: Clinicopathology, susceptibility, and molecular identification. *Med Mycol*. 2020;58(2):172-80.
5. Salgado CG, et al. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from thorns of *Mimosa pudica*, a probable natural source of chromoblastomycosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2004;46:33-6.
6. Santos AL, et al. Biology and pathogenesis of *Fonsecaea pedrosoi*, the major etiologic agent of chromoblastomycosis. *FEMS Microbiol Rev*. 2007;31:570-91.
7. Gajurel K, Ahrens WA. Medlar bodies of chromoblastomycosis. *Transpl Infect Dis*. 2023;25(3):e14047.
8. Ameen M. Chromoblastomycosis: clinical presentation and management. *Clin Exp Dermatol*. 2009;34(8):849-54.
9. Stark R, Grzelak M, Hadfield J. RNA sequencing: the teenage years. *Nat Rev Genet*. 2019;20(11):631-56.
10. Li Song et al. "Rcorrector: efficient and accurate error correction for Illumina RNA-seq reads." *GigaScience*, 4 (2015). <https://doi.org/10.1186/s13742-015-0089-y>.
11. Di Tommaso P, Chatzou M, Floden EW, Prieto Barja P, Palumbo E, Notredame C. Nextflow enables reproducible computational workflows. *Nat Biotechnol*. 2017;35(4):316-9.
12. Patel H, et al. nf-core/rnaseq v3.14.0. *Zenodo*. 2024. doi:10.5281/zenodo.10471647.
13. Lataretu M, Hölzer M. RNAflow: An effective and simple RNA-Seq differential gene expression pipeline using Nextflow. *Genes*. 2020;11(12):1487.

## 6. Anexos

[PIBIC-24-25](#)

[Genes Up e down regulated](#)

[multiqc\\_reports](#)