IGOR RODRIGUES DA COSTA

ALFIE: UM PROGRAMA PARA A BUSCA EXAUSTIVA DE LOCOS ANÔNIMOS E SUA VALIDAÇÃO EM GENOMAS DE *HOMINÍDEOS*

Rio de Janeiro
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA LEOPOLDO DE MEIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BIOLÓGICA

IGOR RODRIGUES DA COSTA

ALFIE: UM PROGRAMA PARA A BUSCA EXAUSTIVA DE LOCOS ANÔNIMOS E SUA VALIDAÇÃO EM GENOMAS DE HOMINÍDEOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador:Prof. Francisco Prosdocimi,Ph.D

Coorientador: Prof. William Bryan Jennings, Ph.D

Rio de Janeiro
2015

Costa, Igor Rodrigues da

C6783 Alfie: um programa para a busca exaustiva de locos anônimos e sua validação em genomas de *hominídeos* / Igor Rodrigues da Costa. – Rio de Janeiro, 2015.

62 f.

Orientador: Francisco Prosdocimi

Coorientador: William Bryan Jennings

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Programa de Pós-graduação em Química Biológica, 2015.

1. Locos Anônimos. 2. Bioinformática. 3. Genômica Comparativa. I. Prosdocimi, Francisco, orientador. II. Jennings, William Bryan, coorientador. III. Título.

IGOR RODRIGUES DA COSTA

ALFIE: UM PROGRAMA PARA A BUSCA EXAUSTIVA DE LOCOS ANÔNIMOS E SUA VALIDAÇÃO EM GENOMAS DE HOMINÍDEOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Aprovada em / /

_____

Prof. Francisco Prosdocimi, Ph.D, UFRJ, Orientador

_____

Prof. William Bryan Jennings, Ph.D, UFRJ, Coorientador

_____

Prof. Carlos Eduardo Guerra Schrago, Ph.D, UFRJ

_____

Prof.ª Cristina Yumi Miyaki, Ph.D, USP

_____

Prof. Fernando Araujo Monteiro, Ph.D, FIOCRUZ

_____

Prof. Franklin David Rumjanek, Ph.D, UFRJ, Suplente

A você, caro leitor

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Onir e Gisele, ao meu irmão Eric e a toda a minha família, pelo amor e por me incentivarem a aprender mais desde a infância.

Agradeço à Claudia, minha namorada fofinha, por me aturar, amar e por ser a pessoa com quem eu compartilho as coisas pequenas e grandes.

Agradeço especialmente ao meu orientador e amigo, Prof. Francisco por ter aberto minha mente a novas ideias e me guiado no mundo da bioinformática.

Agradeço aos colaboradores deste trabalho ao Prof. Franklin por ter aceitado revisar este trabalho e ao Prof. Bryan, coorientador deste trabalho, com sua empolgação contagiante e sua essencial contribuição realizando as análises de genética populacional.

Agradeço aos amigos do Lâmpada e do Laboratório de Biologia Molecular do Câncer, Nívea, Mariana, Juan, Bruna, Ana Carolina, Violeta, Nicholas, Marcela e todos os outros, pela amizade, apoio e festas (!) e por serem uma excelente compania.

Agradeço aos colegas do LADETEC, pela amizade, apoio e compreensão durante a elaboração deste trabalho.

Agradeço aos professores da banca, Prof. Carlos, Prof.ª Cristina e Prof. Fernando por aceitarem avaliar este trabalho e pelas críticas.

Esta dissertação, que é apenas mais um passo da minha inevitável conquista mundial, é dedicada ao meu amigo Alex, numa homenagem póstuma para aquele que seria hoje meu companheiro de pesquisa em bioinformática e de piadas e jogos nerds. *May the force be with you*.

Resumo

COSTA, Igor Rodrigues da. **Alfie: um programa para a busca exaustiva de locos anônimos e sua validação em genomas de hominídeos**. 2015. Tese (Mestrado em Química Biológica) – Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

As novas tecnologias de sequenciamento provocaram um aumento exponencial na quantidade de genomas completos e parciais disponíveis. Estes genomas podem ser utilizados para a predição de marcadores genéticos ideais para genética de populações, em regiões sob seleção neutra e com segregação independente, chamados de locos anônimos. Este trabalho descreve a criação de um método computacional de alta eficiência para a predição de locos anônimos em genomas completos ou parciais. O programa, chamado *alfie,* foi criado usando a linguagem de programação python em conjunto com a biblioteca biophyton e contém 2 500 linhas de código. Para encontrar os locos anônimos, o *alfie* seleciona regiões com distância maior que 200 kb de genes ou de outros locos e procura estas regiões em outros genomas, filtrando apenas os locos com cópia única. O *alfie* foi aplicado em quatro genomas de Hominídeos: *Homo* sapiens (humano), *Gorilla gorilla* (gorila), *Pan troglodytes* (chimpanzé) e *Pongo abelii* (orangotango), gerando um conjunto de 300 locos anônimos. Estes locos anônimos foram submetidos à análise filogenética, predição de modelos de substituição e estimativa de população ancestral efetiva e tempo de divergência. Os parâmetros de tamanho efetivo de população ancestral foram estimados entre 37 000 e 50 000, 40 000 e 43 000, 72 000 e 95 000 para as linhagens humano-chimpanzé, gorila e orangotango, respectivamente. Já os parâmetros de tempo de divergência foram estimados em 4,3; 6,1 e 12,3 Ma, respectivamente para os mesmos clados. Esses parâmetros foram obtidos com um intervalo de confiança de 95% consideravelmente menor do que os dados publicados previamente, devido a quantidade imprecedente de locos não ligados obtidos neste trabalho.

Palavras-chave: Bioinformática, genômica, locos anônimos, genética populacional

Abstract

COSTA, Igor Rodrigues da. **Alfie: um programa para a busca exaustiva de locos anônimos e sua validação em genomas de hominídeos**. 2015. Tese (Mestrado em Química Biológica) – Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

New sequencing technologies have caused an exponential increase in complete and partial genome availability. These genomes can be useful for ideal genetic marker prediction, to be used in population genetics. Such markers, called anonymous loci, should be under neutral selection, single copy and be independently segregated. This work describes the development of a new high efficiency computational method for anonymous loci prediction in complete or partial genomes. The program, named *alfie* (anonymous loci finder), was created using python programming language along with biopython library and contains 2 500 lines of code. In order to find anonymous loci, *alfie* selects regions further than 200 kb from genes and other loci and search for homologous regions in other genomes, filtering only single copy loci. *Alfie* was validated using four Hominidae genomes: *Homo* sapiens (human), *Gorilla gorilla* (gorilla), *Pan troglodytes* (chimpanzee) e *Pongo abelii* (orangutan), generating a 300 anonymous loci dataset. These loci were submitted to phylogenetic analysis, substitution model prediction and population genetic parameter estimation. The ancestral effective populations sizes were estimated to be between 37 000 and 50 000, 40 000 and 43 000, 72 000 and 95 000 for the human-chimp, gorilla and orangutan lineages, respectively. Likewise, the divergence time parameters were estimated to be 4,3; 6,1 and 12,3 MYA, respectively for the same clades. These parameters had a considerably shorter 95% confidence interval than previously published data, a direct consequence of the unprecedented large number of unlinked loci studied.

Keywords: Bioinformatics, genomics, anonymous loci, population genetics

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Siglas

AL	Loco Anônimo *(Anonymous Loci)*
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único *(Single Nucleotide Polymorphism)*
GFF	*General Feature Format*
NGS	Sequenciamento de Nova Geração *(Next Generation Sequencing)*
bp	Pares de Base *(Base Pair)*
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia *(Polymerase Chain Reaction)*
Ma	Milhões de anos

Sumário

1 Introdução

1.1 Breve história da genômica

A palavra "genômica" surgiu em uma discussão de bar para decidir o nome de uma nova revista científica em 1986 [1], focada em dados gerados pela exploração e comparação de genomas. Esta nova área nasceu junto com a era do "projeto genôma humano", e trouxe inovações para a ciência e a sociedade, criando novos campos como a medicina personalizada e a filogenômica. O campo da genômica hoje está em franca expansão, uma projeção atual indica que, se a taxa de crescimento se mantiver, são esperados que 10 000 genomas de vertebrados sejam sequenciados nos próximos 10 anos [2].

Isso deve-se à nova geração de técnicas para sequenciamento de DNA, que tem feito com que este seja cada vez mais barato, eficiente e livre de erros [3]. A última década viu um decaimento exponencial do preço de sequenciamento (ANEXO A) que influenciou diretamente no crescimento exponencial da quantidade de genomas completos e parciais disponíveis e publicados [3, 4]. As técnicas hoje chamadas de *Next Generation Sequencing* (NGS) incluem diversas plataformas e tecnologias, tendo como fator comum o baixo preço e a enorme quantidade de dados gerados por corrida, superando em muitas ordens de grandeza (por volta de 10^8) o método de sequenciamento de Sanger.

A proliferação destas novas técnicas gerou uma avalanche de projetos que buscam a descrição inicial dos genomas de espécies modelo e também, cada vez mais, de qualquer organismo de interesse. O sequenciamento completo de um genoma, ainda hoje, não é uma tarefa trivial, pois regiões altamente repetitivas são uma barreira para os algoritmos de montagem, já que as técnicas de NGS produzem sequências curtas [5]. A anotação deste genoma, que envolve a indentificação de regiões codificantes e regulatórias, é um processo contínuo e iterativo, novas versões de genomas modelo, como o do *Homo Sapiens,* são lançadas regularmente. Portanto, é muito comum que genomas sejam disponibilizados em estágios iniciais de montagem e anotação, como genomas parciais.

1.2 Amadurecimento da genômica computacional

Da necessidade de explorar essa grande coleção de dados biológicos, normalmente medidos em gigabytes, que se acumula, surgiu a genômica computacional. Esta área se concentra na criação e aplicação de ferramentas para análise, comparação e descrição de genes, genomas e sistemas.

Bancos de dados são a matéria-prima dos estudos computacionais em problemas que envolvem "*Big Data*". Na biologia computacional, os bancos de dados são gerados para organizar o conhecimento de modo que futuros estudos sejam facilitados. Estes bancos são disponibilizados na internet em grandes plataformas, como a do NCBI para genes [6], taxonomias [7], proteínas [8], ou o ENSEMBL [9], que é um banco de dados de genomas completos para organismos modelo.

A magnitude da produção de dados torna inviável a análise manual para a maioria dos casos, por isso o uso de programas de computador em laboratórios de genômica é essencial. Predição de genes, montagem de genomas, reconstrução filogenética e alinhamento múltiplo de sequências são algumas das tarefas realizadas hoje quase que exclusivamente por programas de computador especializados. O presente trabalho conta com a utilização intensiva, e principalmente, a criação de ferramentas computacionais, para solução de problemas na área de genética de população. Essas novas ferramentas permitirão um ganho de produtividade e rendimento relativo a técnicas manipulação *in vitro*.

1.3 Porque estudar genética de populações

Para entender a dinâmica da evolução, migração e a história de diversos indivíduos de uma mesma espécie, é preciso observá-los no nível molecular. As pistas de eventos passados podem ser observadas no DNA, que é muitas vezes a única maneira de reconstruir os passos das populações e entender as pressões seletivas atuantes.

1.3.1 O modelo dos Hominidae na genética de população

Os hominídeos são um grupo modelo para estudos de genética de população devido a grande curiosidade e importância dada a história da espécie humana. O tempo de divergência entre humanos e outros hominóides tem recebido muita atenção nas últimas decadas [10-12]. Por exemplo, um estudo de sequências mitocondriais [13] encontrou tempos de divergência de 7,7 milhões de anos (Ma) para a linhagem do gorila, enquanto que um estudo do pseudogene de η-globina [14] encontrou valores próximos a 5,8 Ma.

Do mesmo modo, a história do clado Hominidae tem sido muito estudada [11, 12, 15, 16]. Normalmente, esta é inferida em grande parte pelo tamanho efetivo de população ancestral, que informa a ocorrência de gargalos populacionais. De particular interesse é a questão da existência de um gargalo populacional após a divergência entre a espécie humana e os chimpanzés. Um dos estudos com mais citações que tentou responder esta questão foi o de Chen e Li [12], que utilizou 53 locos anônimos nucleares para gerar uma das estimativas mais precisas destes parâmetros.

Apesar dos hominídeos serem um dos grupos mais bem estudados, ainda não existe um consenso para as datações e valores de tamanho de população ancestral, devido a uma incerteza gerada pela diferença das datas obtidas por diferentes métodos e pela baixa precisão dos valores adiquiridos utilizando poucos marcadores. Assim, este trabalho busca criar um método de predição automática de marcadores ideais, de modo a aumentar a quantidade e qualidade dos marcadores e a precisão dos estudos de genética de populações que os utilizarem.

1.4 Marcadores genéticos

Marcadores genéticos são sequências de DNA que, por apresentarem variações, podem ser usadas para diferenciar organismos ou espécies. O primeiro marcador genético a ser desenvolvido, 30 anos atrás, se aproveitava de variações nos sítios alvo de enzimas de restrição para criar *fingerprints* genéticos e são usados até hoje na ciência forense e em testes de paternidade [17]. Avanços nas técnicas de sequenciamento nos últimos 30 anos permitiram o desenvolvimento

de diversos novos marcadores genéticos, como microssatélites, polimorfismos de nucleotídeo único (SNP, *single nucleotide polymorphism*) e os locos anônimos (AL, *anonymous loci*).

Os marcadores genéticos são ferramentas versáteis, sendo úteis em campos como a ciência forense, testes de paternidade, medicina personalizada e diagnóstica, genética de população, filogenia e agropecuária, entre outros.

1.4.1 Microssatélites

Um dos marcadores genéticos mais usados, por já possuir uma técnica de mapeamento e análise bem estabelecida em diversos organismos, são os microssatélites. Microssatélites pode ser definidos como regiões hiper-variáveis compostas por repetições de pares de bases ou de motivos simples (como di, tri, tetra, penta e até hexa-nucleotídeos). A diferenciação de organismos e populações é feita pela variação do tamanho desta região, que é normalmente obtida por meio de amplificação por PCR ou sequenciamento direto. Locos de microssatélites são comumente conservados em espécies relacionadas, tornando possível a utilização do mesmo marcador para espécies do mesmo gênero.

1.4.2 SNPs

Outra classe de marcadores genéticos, os polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*) são variações de uma única basepresentes em pelo menos 1% da população. O baixo custo para predição de SNPs, decorrente das técnicas de pirosequenciamento [18] facilitou o desenvolvimento de bibliotecas contendo milhões de SNPs. Essa explosão de capacidade de sequenciamento fez com que estes marcadores se tornassem muito usados em estudos de associação genômica, onde se busca correlacionar a variação genotípica com características fenotípicas. Além disso, são também usados para estudar a migração e a filogeografia de populações, incluindo a dos seres humanos.

1.5 Locos anônimos, os marcadores ideais

As análises de genética de populações costumam assumir diversos pressupostos sobre os marcadores estudados, como herança mendeliana,

dispersão homogênia no genôma e neutralidade quanto à aptidão do organismo. Locos anônimos (ALs) são marcadores que, por definição, respeitam todas estes requisitos e são, portanto, as regiões com características ideais para estudos de genética de população e filogenia. As principais características dos ALs são:

1. Apresentar cópia única no genoma;
2. Estar sob seleção neutra;
3. Segregar independentemente.

Apesar de serem marcadores excelentes e muito informativos, as técnicas mais usadas para descrição de ALs requerem curadoria manual das sequências obtidas e são muito caras e trabalhosas. Isto ocorre porque estas técnicas são baseadas na amplificação por PCR e sequenciamento de regiões aleatórias do genoma. Considerando que aproximadamente 90%-95% do genoma humano é não codificante [19], é esperado que por volta de 10% dos locos retirados de regiões amplificadas aleatoriamente estejam em regiões gênicas. Uma fração ainda maior pode estar em regiões regulatórias próximas a estes genes, sujeita a seleção não-neutra. Estes marcadores requerem verificação manual cuidadosa para filtragem dos fragmentos amplificados localizados em regiões codificantes após seu sequenciamento, o que traz uma dificuldade maior para o desenvolvimento de um número expressivo de marcadores. Por ser uma técnica árdua, muitos estudos usam por volta de 10 a 50 locos [20-22], levando meses ou semanas para a obtenção destes locos.

Locos anônimos apresentam diversas vantagens sobre marcadores convencionais como SNPs e microssatélites. Primeiramente, são marcadores mais informativos, pelo simples fato de serem maiores em número de bases. Os fragmentos sequenciados costumam ter em torno de 1 kb, muito maiores que os 100-500 bp dos microssatélites ou 1 bp para os SNPs. Esta vantagem também faz com que este marcador possa ser usado numa extensão maior de tempo de divergência entre espécies enquanto que técnicas baseadas em microssatélites são muito efetivas para análise populacional, mas falham em estudos que envolvem espécies diferentes por variações na região de ligação do *primer* [23].

Outra vantagem é a presença de diversos tipos de variação, como substituição, deleção e inserção, no mesmo marcador, permitindo a estimativa

mais precisa para parâmetros de taxa de mutação. Por outro lado, ALs são mais difíceis de obter, são menos eficientes que marcadores gênicos para espécies distantes e não tem utilização tão difundida quanto SNPs ou microssatélites.

1.5.1 Estado da arte na descoberta e descrição de locos anônimos

Técnicas *in silico* para descoberta de locos anônimos em dados de NGS são um desenvolvimento recente [24], porém ainda não existem técnicas que permitam garantir que estes marcadores não estejam associados a regiões sob seleção ou de cópia única. O presente trabalho apresenta uma nova solução para estes problemas, se aproveitando da disponibilidade de genomas completos em bancos de dados na internet.

2 Objetivo

Desenvolver uma metodologia *in silico* para descoberta de locos anônimos em genomas completos e aplicá-la no modelo dos Hominidae.

2.1 Objetivos específicos

- Produzir um programa para obter locos distantes de genes em arquivos completos de genoma com anotação de regiões regulatórias;
- Encontrar os ortólogos dos locos nas espécies estudadas;
- Verificar a distribuição dos locos encontrados ao longo do genoma de referência;
- Reconstruir árvores filogenéticas e estimar o modelo de substituição para cada loco encontrado em todos os genomas;
- Estimar os parâmetros de população ancestral efetiva e tempo de divergência para o grupo dos hominídeos.

3 Desenvolvimento

3.1 Programas, bibliotecas e linguagem

Este programa foi desenvolvido na linguagem Python, versão 2.7, com o auxílio da biblioteca Biopython [25] e de programas auxiliares: BLAST+ [26] para busca de sequências e PhyML [27] para reconstrução de árvores filogenéticas. O programa foi chamado de *alfie* (*anonymous loci finder*) e disponibilizado com licença de código aberto GPL. O *alfie* pode ser obtido a partir do repositório git hospedado no *github*: https://github.com/igorrcosta/alfie. Neste site também está um manual completo de uso do programa (APÊNDICE 2).

3.2 Alfie

O *alfie* é um programa que efetua os diversos passos e filtros para busca e obtenção exaustiva de locos anônimos em genomas completos. A interface atual do programa é por linha de comando, usando *flags* para configurar as opções de análise. O *alfie* recebe, como arquivos de entrada, dois ou mais genomas em formato FASTA, sendo um deles o genoma de referência, e um arquivo GFF de anotação do genoma de referência, retornando os ALs encontrados em todos os genomas.

3.3 Busca de regiões anônimas

O primeiro passo do programa é, a partir de um genoma referência e um arquivo contendo a anotação das regiões funcionais (GFF), selecionar todas as regiões que estão a uma distancia superior a 200 kb de qualquer gene (em uma análise mais conservadora, podem ser excluídas também as regiões próximas a pseudogenes). Regiões próximas (10 kb) dos telômeros, que são as regiões terminais dos cromossomos, também são excluídas. (Fig. 1 A)

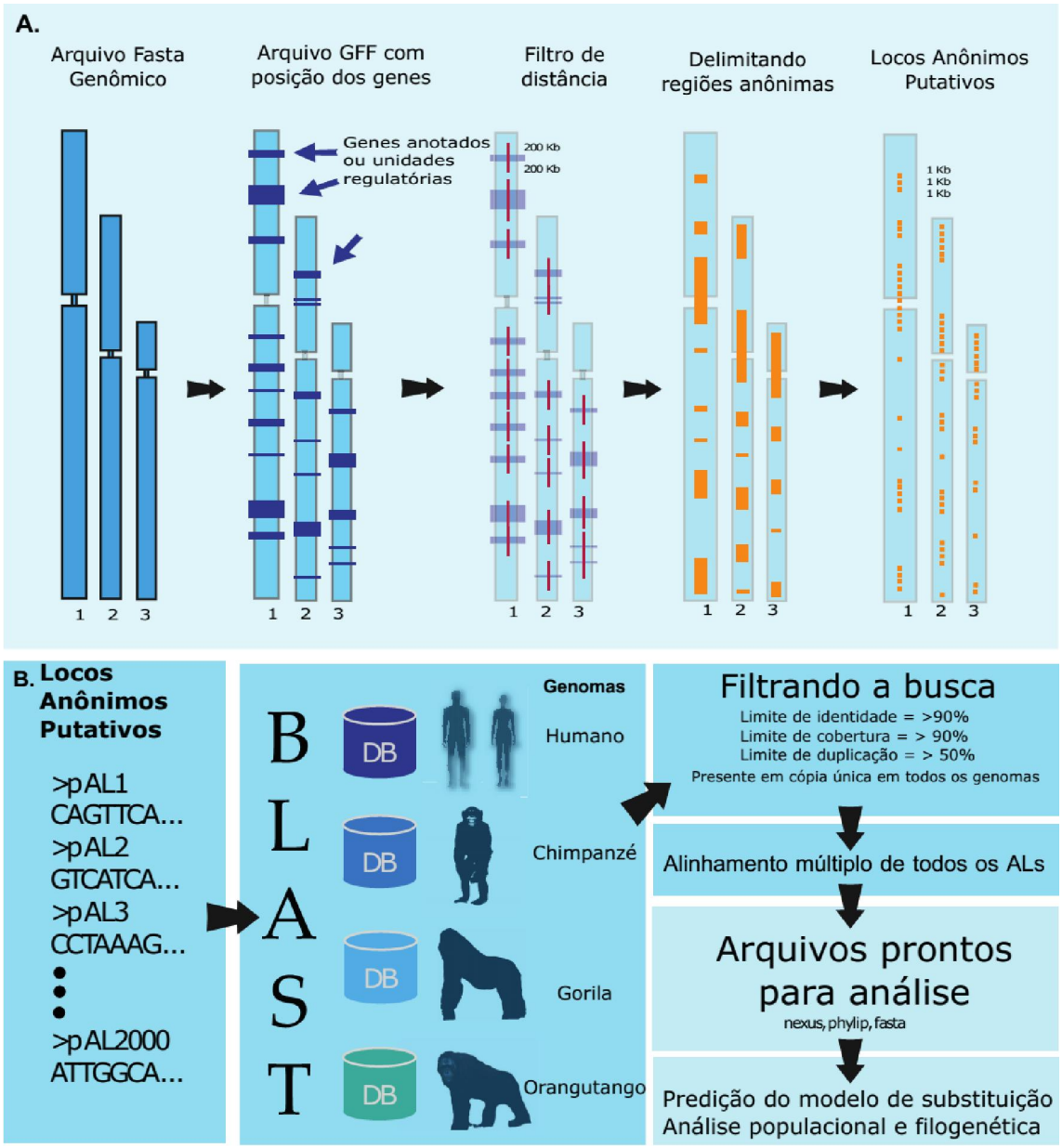


Figura 1: Algoritmo do *alfie*

3.3.1 Locos putativos

As regiões anônimas do genoma de referência são recortadas em fragmentos de 1 kb, de modo diminuir a chance de que eventos de recombinação tenham ocorrido dentro do próprio loco. Estes fragmentos são recortados apenas de regiões anônimas sem bases não identificadas ("N"s). Ao fim, esses

fragmentos, chamados de locos anônimos putativos, são salvos em um arquivo FASTA (Fig. 1 A).

3.4 Busca por homólogos

Para gerar um banco de dados útil para análise filogenética o programa busca locos homólogos aos locos putativos do genoma de referência (Fig. 1 B). Os locos anônimos putativos são usados como *query* para busca em todos os genomas estudados. Usando os parâmetros padrões ao executar o programa, uma cópia homóloga é definida por no mínimo 90% de cobertura e 90% de identidade com a sequência de referência. Do mesmo modo, é considerada repetição qualquer sequência que possua mais de uma cópia com mais de 50% de identidade e 90% de cobertura.

Apenas os locos encontrados sem repetições em todos os genomas são selecionados para o próximo passo da análise.

3.5 Alinhamento múltiplo

As sequências homólogas encontradas na busca por BLAST são extraídas dos genomas e salvas em arquivos FASTA. Cada arquivo é alinhado separadamente pelo programa ClustalW [28]. São selecionados apenas as sequências que possuam acima de um certo número de bases alinhadas (por padrão, 500 bp). Destes locos são escolhidos o número máximo de locos de modo que todos estejam a uma distância superior a 200 kb do loco mais próximo, garantindo a segregação independente destes locos, que agora já podem ser considerados verdadeiros locos anônimos.

Os alinhamentos são salvos em diversos formatos, como FASTA, NEXUS e PHILIP, facilitando análises posteriores.

3.6 Outros recursos do pacote *alfie*

Os passos realizados pelo programa *alfie* também podem ser realizados independentemente e com a adição de novos parâmetros e etapas. Um preditor de *primer* baseado no programa *primer3* está incluído, tornando possível, por exemplo,construir *primers* de locos putativos, retirados de um genoma referência,

para amplificar e sequenciar em espécies próximas que não possuam o genoma completo ou parcial disponíveis

Outras etapas que podem ser realizadas ao final da análise são a reconstrução filogenética e predição dos modelos de substituição, realizados por *scripts* que executam os programas *PhyML* [27] e *modeltest* [29], respectivamente.

O *alfie* também pode ser configurado para encontrar regiões próximas a genes para comparação, utilizando distâncias negativas no parâmetro da distância gênica. Por exemplo, definindo o parâmetro de distância gênica em −2 000 bp, os locus serão extraídos a uma distância máxima de 2 kb dos genes.

4 Resultados e Discussão

Após o desenvolvimento do *alfie*, este foi aplicado para a busca de locos anônimos nos genomas de Humano, Chimpanzé, Gorila e Orangotango. Os ALs encontrados foram analisados para obtenção de uma nova estimativa dos parâmetros populacionais destas espécies.

4.1 Busca de locos anônimos em genomas completos de Hominidae

Os genomas utilizados foram os seguintes: *Homo sapiens* versão 38, *Pan troglodytes* versão 2.1.4, *Gorilla gorilla* versão 3.1 e *Pongo abelii* versão 2, todos eles com repetições e regiões de baixa complexidade mascaradas.

4.1.1 Busca por regiões anônimas

Foram encontrados aproximadamente 247 Mb em regiões anônimas no genoma humano, equivalente a 8% do genoma. Destas regiões, 228 Mb (92,5%) foram mascaradas por serem de baixa complexidade ou representavam bases não identificadas ("N"s). A partir das regiões anônimas restantes (18 Mb, ~0,6% do genoma total) foram extraídos 4 233 locos anônimos putativos, cada um deles com 1 kb de extensão. Os locos putativos encontrados apresentaram uma distribuição cromossomal proporcional ao tamanho da região anônima não mascarada de cada cromossomo (Fig. 2).

4.1.2 Filtragem por conservação e unicidade

Os 4 233 locos anônimos putativos encontrados no genoma humano foram usados como *query* na busca por homólogos e duplicações em todos os genomas estudados. Nesta busca foram encontrados apenas 304 locos anônimos que apresentam cópia única e alta identidade em cada um dos genomas.

4.2 Análise dos locos anônimos de Hominidae

Do conjunto de 304 ALs gerados foram aleatoriamente selecionados 300 ALs para análise detalhada.

4.2.1 Mapeamento dos locos anônimos por cromossomo

A distribuição de ALs no genoma foi similar a distribuição de ALs putativos (Fig. 3) apresentando uma relação linear entre o tamanho e o número de ALs para a maioria dos cromossomos. As exeções podem ser explicadas por variações nos tamanhos de regiões anônimas não repetitivas de cada cromossomo (Fig. 2).

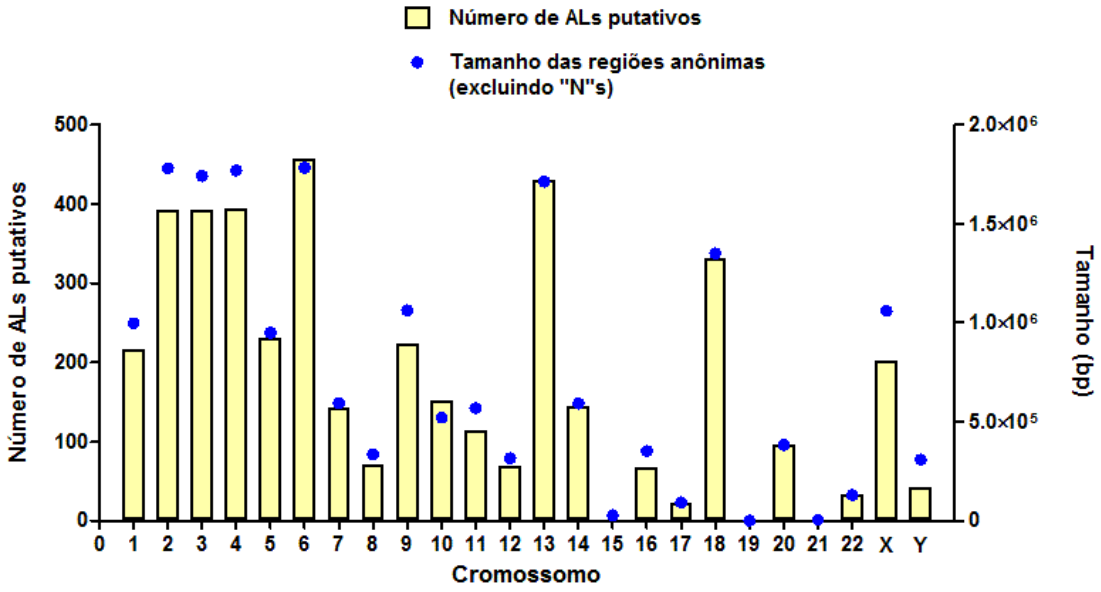


Figura 2: Distribuição dos ALs putativos e regiões anônimas

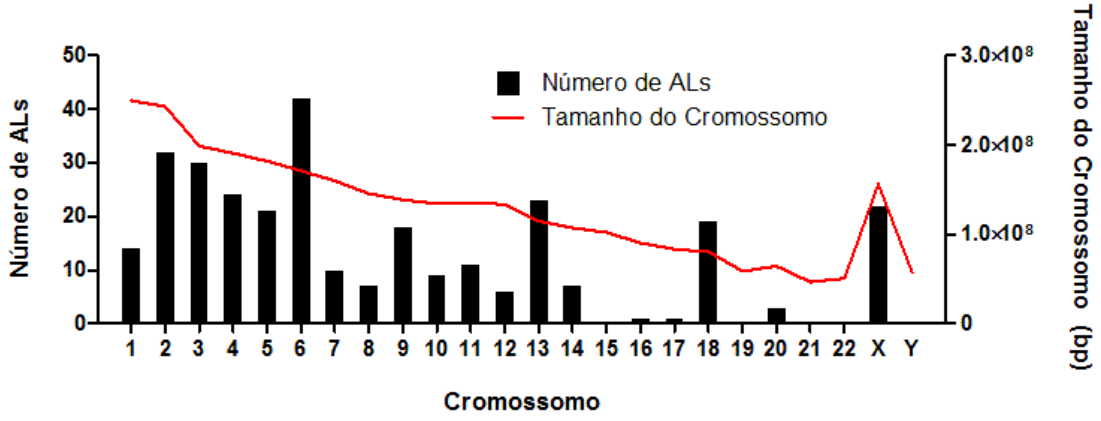


Figura 3: Distribuição dos ALs encontrados

4.2.2 Modelos de substituição

Os 300 ALs foram submetidos a predição de modelos de substituição usando o programa *modeltest* (Fig. 4). Dentre os 88 modelos possíveis [30], a grande maioria dos ALs (210/300) foi mais bem representada pelo modelo HKY (Hasegawa, Kishino e Yano) [31] que consiste em apenas cinco parâmetros, um para cada base e um para a taxa de transição/transversão (Ti/Tv). Este resultado demonstra que as regiões anônimas do genoma de Hominidae estão sujeitas, basicamente, a um modo de evolução simples, compatível com a hipótese de evolução neutra.

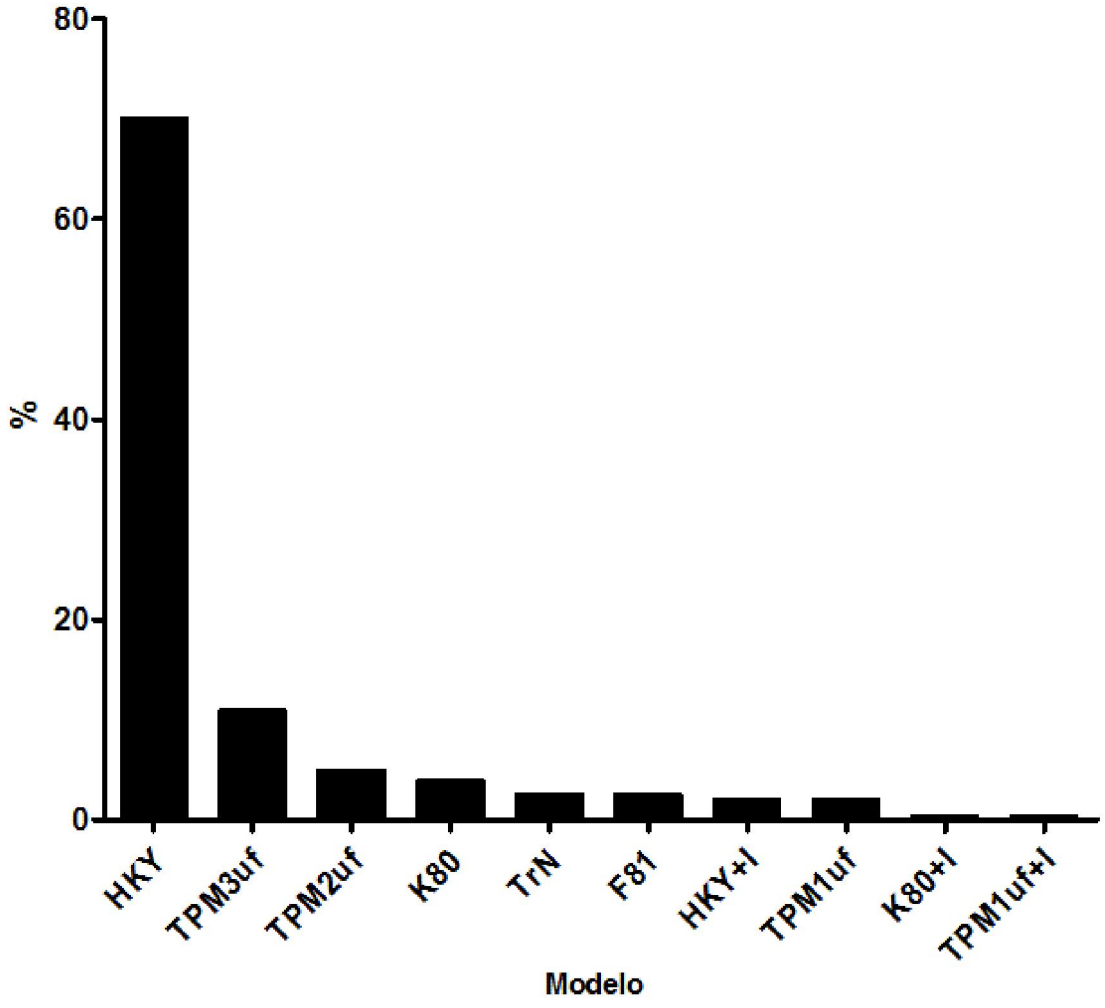


Figura 4: Modelos de substituição preditos

4.2.3 Filogenia

Na análise filogenética dos 300 ALs, gerando uma árvore enraizada para cada loco, 64% das árvores exibiram a relação esperada entre humanos e chimpanzé (193/300), e por volta de 20% apresentaram as duas topologias alternativas ((H,G),C) e ((C,G),H) (Tabela 1).

Estes resultados concordam com a frequência de topologias esperadas pela teoria da coalescência [32] e resultados empiricos publicados [12].

4.2.4 Estimativa da população efetiva e tempo de divergência

As análises de genética populacional foram realizadas em colaboração com o Prof. Bryan Jennings usando o programa BP&P [33, 34]. A estimativa dos parâmetros populacionais obteve resultados semelhantes aos já publicados [12, 35]. Os resultados foram comparados com os de Chen e Li de 2001 [12], que obteve estas estimativas a partir de um conjunto de 53 locos nucleares e é um dos trabalhos mais citados da área.

Foi observado que o intervalo de confiança de 95% das estimativas de tempo de divergência foram reduzidos entre duas a três vezes (Fig. 5) nas estimativas geradas a partir do conjunto de 300 locos. Foram estimados em 4,3 Ma o tempo de divergência entre humanos e chimpanzés e em 12,3 Ma o tempo de divergência da linhagem do orangotango, 0,5 e 1,8 Ma mais recente do que o estimado utilizando o conjunto de 53 locos respectivamente. Ambos conjuntos concordaram no tempo de divergência do gorila em valores próximo a 6 Ma (5,9 utilizando 53 locos e 6,1 utilizando 300).

Para os parâmetros de tamanho efetivo de população ancestral as análises foram feitas usando tempo de geração (TG) variável ou fixo em 20 anos. Analizando o conjunto de 300 locos, as estimativas para o ancestral humano-chimapanzé variaram entre 37 000 e 50 000, dependendo do TG utilizado, enquanto que as estimativas usando 53 locos variaram entre 17 000 e 23 000 (Fig. 6). De modo similar, o tamanho de população efetiva para o ancestral humano, chimpanzé, gorila foi estimada entre 40 000 e 43 000 para todos os conjuntos de dados.

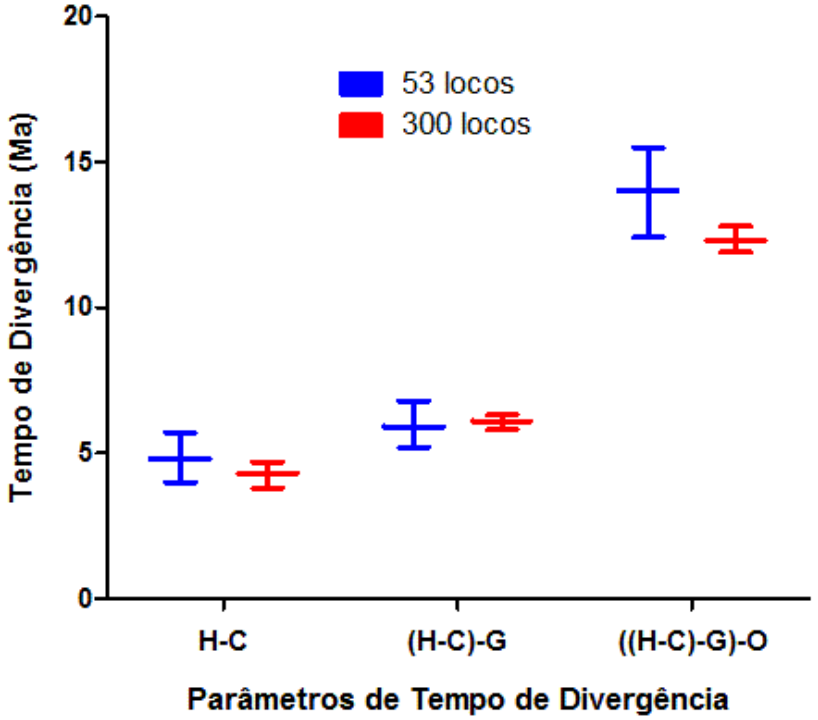


Figura 5: Estimativa do tempo de divergência dos Hominidae

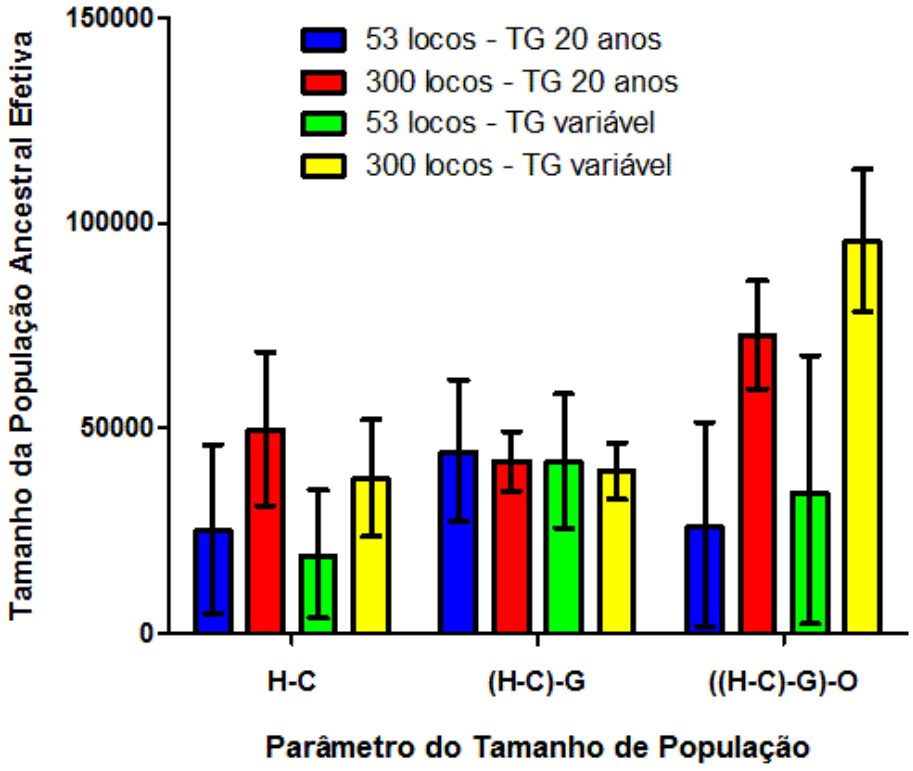


Figura 6: Estimativa do tamanho efetivo de população

Houve, porém, uma diferença considerável nas estimativas para o tamanho de população efetiva da linhagem hominóide ancestral. O *dataset* de 53 locos forneceu uma estimativa variando entre 21 000 e 33 000 enquanto que os valores estimados a partir do conjunto de 300 locos foi bem maior, entre 72 000 e 95 000. Não foram observadas diferenças no intervalo de confiança para a linhagem ancestral humano-chimpanzé, mas as outras duas estimativas (ancestral humano-chimpanzé-gorila e hominóide) tiveram seus intervalos reduzidos pela metade.

Todas estas análises foram repetidas e resultados semelhantes foram obtidos utilizando priores bayesianos exponenciais, demonstrando robustez para a escolha de priores.

4.2.5 Teste de neutralidade

Os valores da razão transição/transverção (Ti/Tv), que é um dos parâmetros estimados pelo programa *modeltest*, apresentaram uma distribuição unimodal de média 2,3 ± 0,9 (Fig. 7). Esta distribuição é uma evidência de que sitios intergênicos neutros seguem um único modo de evolução.

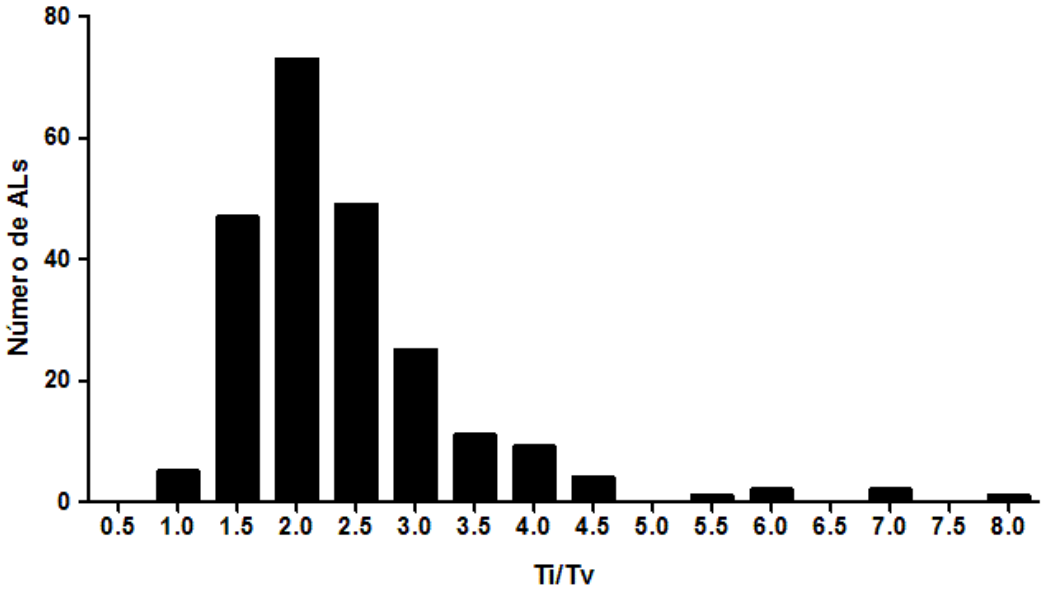


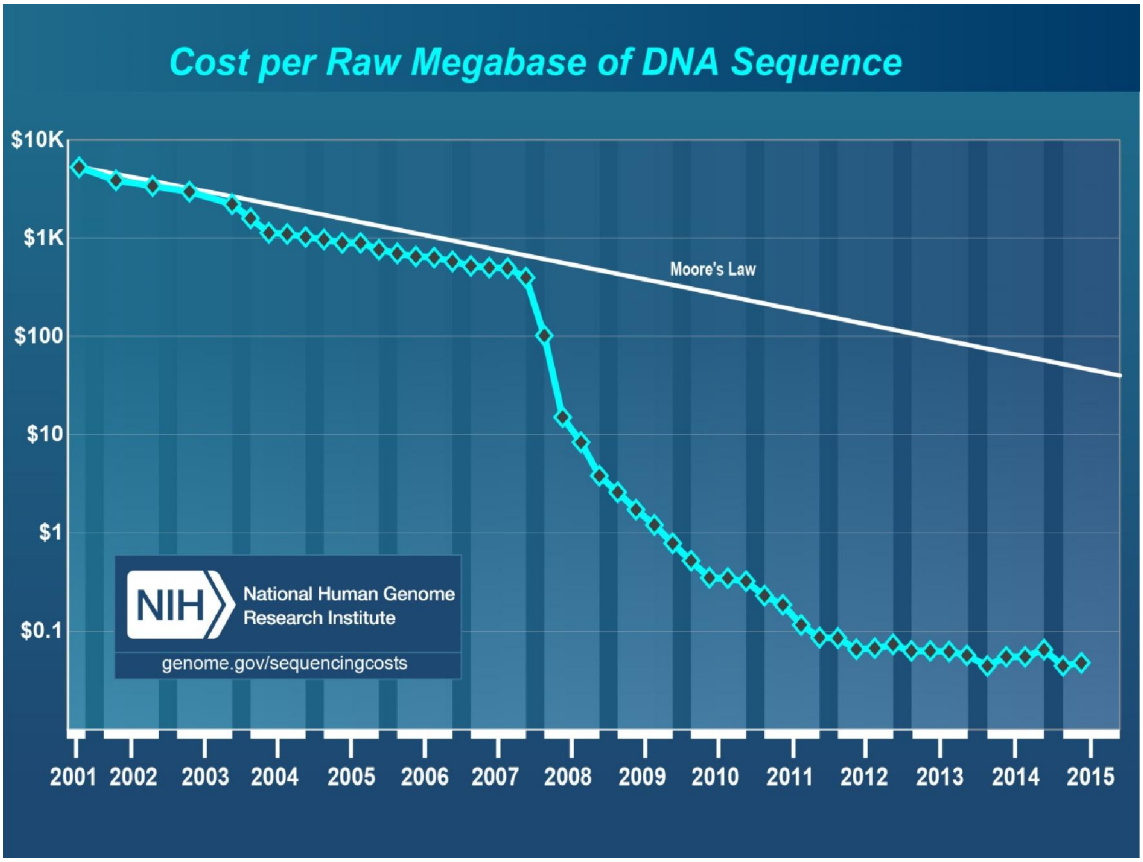
Figura 7: Histograma dos valores de Ti/Tv encontrados

5 Conclusão

Neste trabalho foi desenvolvido um programa que sugere uma solução para o problema da predição de locos anônimos em genomas completos ou parciais usando uma abordagem totalmente computacional (*in silico*). Embora o tempo de desenvolvimento da ferramenta tenha sido de cerca de 3 anos, agora esse problema pode ser resolvido com extrema facilidade em algumas horas, facilitando enormemente o trabalho de busca por locos anônimos. Este programa foi capaz de gerar 300 locos anônimos conservados para o grupo dos Hominidae, utilizando quatro genomas completos. Estes 300 locos foram analisados e foram obtidos resultados compatíveis com trabalhos publicados, validando o programa. Além disso, foi obtido um valor de Ti/Tv médio para as regiões não codificantes de hominóides. Finalmente, foram obtidas estimativas de parâmetros populacionais de hominídeos mais precisos que os já publicados. Esperamos que o nosso trabalho se demonstre como o novo padrão a ser comparado para as estimativas de parâmetros populacionais dos Hominidae.

Anexos

ANEXO A – DECAIMENTO EXPONENCIAL DO CUSTO DE SEQUENCIAMENTO



Extraído de http://www.genome.gov/sequencingcosts/

Apêndices

APÊNDICE A – SUMÁRIO DOS RESULTADOS ENCONTRADOS

Tabela1: Sumário dos resultados encontrados

ID	Cromossomo	Posição Inicial	Posição Final	Topologia	Ti/Tv	Modelo de Substituição
1	1	68744514	68745513	((C,G),H)	2.77	HKY+I
5	1	72507917	72508916	((H,C),G)	N.A.	TPM3uf
9	1	79725749	79726748	((H,C),G)	N.A.	TPM3uf
37	1	88108901	88109900	((H,G),C)	1.94	HKY
50	1	104474803	104475802	((H,C),G)	2.04	HKY
78	1	104827235	104828234	((H,C),G)	N.A.	TPM2uf
89	1	105036129	105037128	((H,C),G)	1.93	HKY
114	1	106289093	106290092	((H,G),C)	N.A.	TPM3uf
132	1	164141460	164142459	((H,C),G)	2.91	HKY
133	1	189343013	189344012	((H,G),C)	2.39	HKY
146	1	191440464	191441463	((C,G),H)	1.52	HKY
172	1	195326778	195327777	((H,C),G)	2.62	HKY
191	1	195534484	195535483	((H,C),G)	2.07	HKY
210	1	195752207	195753206	((H,C),G)	0.97	HKY
219	10	9508281	9509280	((H,C),G)	2.42	HKY
224	10	55958449	55959448	((H,C),G)	1.78	HKY
253	10	56838042	56839041	((H,G),C)	1.87	HKY
259	10	57715895	57716894	((H,C),G)	2.99	HKY
271	10	81424322	81425321	((H,C),G)	2.12	HKY
286	10	81658264	81659263	((C,G),H)	2.10	HKY
289	10	111724861	111725860	((H,C),G)	N.A.	TPM2uf
294	10	128524321	128525320	((H,C),G)	2.86	K80
347	10	130727396	130728395	((H,C),G)	3.70	HKY
374	11	21845057	21846056	((H,C),G)	N.A.	TPM2uf
383	11	36910115	36911114	((H,C),G)	1.46	HKY
397	11	37495524	37496523	((H,C),G)	N.A.	TrN
398	11	38884861	38885860	((H,G),C)	2.19	HKY
405	11	39465300	39466299	((C,G),H)	2.00	HKY+I
410	11	42463677	42464676	((H,C),G)	2.17	HKY

434	11	42665603	42666602	((H,C),G)	2.35	HKY
439	11	81337312	81338311	((H,C),G)	2.26	HKY
444	11	91385993	91386992	((H,C),G)	2.27	HKY
463	11	114918045	114919044	((H,C),G)	3.49	K80
465	11	116164046	116165045	((H,C),G)	3.19	K80
484	12	60626720	60627719	((H,C),G)	3.38	HKY
498	12	60835126	60836125	((H,C),G)	2.38	HKY
519	12	73426393	73427392	((H,G),C)	1.87	HKY
526	12	83386945	83387944	((C,G),H)	3.26	HKY
540	12	83931107	83932106	((C,G),H)	2.75	HKY
546	12	87382934	87383933	((H,C),G)	N.A.	TPM3uf
554	13	22482509	22483508	((H,C),G)	2.25	HKY
560	13	55793867	55794866	((C,G),H)	N.A.	TPM3uf
567	13	56484628	56485627	((C,G),H)	N.A.	F81
585	13	64296706	64297705	((H,C),G)	2.82	HKY
614	13	65510955	65511954	((H,C),G)	1.21	HKY
621	13	72179360	72180359	((H,C),G)	4.68	HKY
631	13	76351053	76352052	((C,G),H)	2.85	HKY
664	13	76597135	76598134	((C,G),H)	1.47	HKY
679	13	80132695	80133694	((H,C),G)	1.63	K80
683	13	81931238	81932237	((C,G),H)	2.65	HKY
704	13	82143317	82144316	((H,C),G)	N.A.	TPM2uf
727	13	82490030	82491029	((C,G),H)	2.05	HKY
742	13	83507578	83508577	((H,C),G)	1.16	HKY
760	13	84227523	84228522	((C,G),H)	4.08	HKY
773	13	84799327	84800326	((H,C),G)	1.61	HKY
782	13	86488112	86489111	((H,C),G)	2.12	HKY
784	13	103650785	103651784	((H,G),C)	2.62	HKY
821	13	103849493	103850492	((C,G),H)	2.27	HKY
857	13	104061299	104062298	((H,C),G)	1.01	HKY
892	13	104295286	104296285	((H,C),G)	N.A.	TPM3uf
923	13	104498915	104499914	((H,C),G)	1.84	HKY
944	13	105015903	105016902	((H,C),G)	2.26	HKY
979	13	105238455	105239454	((C,G),H)	3.24	HKY
996	14	39737967	39738966	((H,C),G)	N.A.	TPM2uf
1023	14	39973727	39974726	((H,C),G)	2.03	HKY

1050	14	40602287	40603286	((H,G),C)	N.A.	TPM3uf
1067	14	83271762	83272761	((C,G),H)	1.98	HKY
1086	14	83474393	83475392	((C,G),H)	2.05	HKY
1098	14	84399968	84400967	((H,C),G)	1.87	HKY
1122	14	86632388	86633387	((C,G),H)	1.37	HKY
1182	16	61262633	61263632	((H,G),C)	N.A.	TPM2uf
1219	17	54255285	54256284	((C,G),H)	N.A.	TPM2uf
1222	18	25563441	25564440	((C,G),H)	3.17	K80
1233	18	28395826	28396825	((H,C),G)	2.73	HKY
1240	18	30143273	30144272	((H,C),G)	2.09	HKY+I
1272	18	30353880	30354879	((H,G),C)	1.50	HKY
1290	18	37895673	37896672	((H,C),G)	4.63	HKY
1323	18	38095162	38096161	((H,C),G)	2.15	HKY
1340	18	38297158	38298157	((H,G),C)	3.19	HKY
1364	18	40349006	40350005	((H,C),G)	2.94	HKY
1405	18	40556148	40557147	((H,G),C)	1.78	HKY
1428	18	40741304	40742303	((H,C),G)	N.A.	TPM2uf
1465	18	40949070	40950069	((H,C),G)	1.47	K80
1493	18	41226829	41227828	((H,G),C)	2.67	HKY
1501	18	43540271	43541270	((H,C),G)	2.04	HKY
1517	18	52113203	52114202	((H,C),G)	1.82	HKY
1519	18	53837849	53838848	((H,C),G)	2.40	HKY
1528	18	61127278	61128277	((H,C),G)	N.A.	TPM3uf
1531	18	64883353	64884352	((H,C),G)	7.76	HKY
1533	18	66281153	66282152	((H,C),G)	2.34	HKY
1537	18	72159816	72160815	((H,C),G)	1.62	HKY
1553	2	13219366	13220365	((H,G),C)	1.66	HKY
1564	2	35997192	35998191	((H,C),G)	2.77	HKY
1583	2	41375562	41376561	((H,C),G)	3.29	HKY
1591	2	49498606	49499605	((H,C),G)	N.A.	TPM3uf
1618	2	53114436	53115435	((H,G),C)	N.A.	TPM2uf
1642	2	116115936	116116935	((H,C),G)	1.14	HKY
1655	2	116330528	116331527	((H,C),G)	2.63	HKY
1670	2	117411742	117412741	((H,G),C)	1.46	HKY
1685	2	118431064	118432063	((H,C),G)	1.93	HKY
1711	2	118610736	118611735	((C,G),H)	3.26	K80

1715	2	122000479	122001478	((H,C),G)	2.13	HKY
1728	2	122203140	122204139	((H,C),G)	2.18	HKY
1750	2	122422345	122423344	((H,C),G)	3.79	HKY
1772	2	122652643	122653642	((H,G),C)	3.43	HKY
1783	2	122861233	122862232	((C,G),H)	N.A.	TPM3uf
1785	2	125207247	125208246	((H,C),G)	2.10	HKY
1805	2	125423956	125424955	((H,C),G)	1.42	HKY
1812	2	128787322	128788321	((H,G),C)	2.41	HKY
1823	2	133802185	133803184	((H,C),G)	1.33	K80
1832	2	139144319	139145318	((H,G),C)	2.10	HKY
1834	2	147101848	147102847	((H,C),G)	2.24	HKY
1847	2	155543931	155544930	((H,C),G)	2.27	HKY
1882	2	155755037	155756036	((H,C),G)	2.43	HKY
1891	2	180240600	180241599	((H,C),G)	1.38	HKY
1894	2	184174075	184175074	((H,C),G)	N.A.	TPM3uf
1898	2	185164829	185165828	((H,C),G)	N.A.	F81
1915	2	192405374	192406373	((H,C),G)	2.03	HKY
1924	2	192995547	192996546	((C,G),H)	2.50	HKY
1930	2	193482992	193483991	((H,C),G)	1.97	HKY
1936	2	195241727	195242726	((H,C),G)	1.56	HKY
1937	2	210880132	210881131	((H,C),G)	N.A.	TPM3uf
1940	2	226422985	226423984	((H,C),G)	2.17	HKY
1945	20	12581284	12582283	((H,G),C)	1.91	HKY
2035	20	39552847	39553846	((H,C),G)	N.A.	TPM3uf
2041	20	55782618	55783617	((H,C),G)	1.40	HKY
2075	3	5463141	5464140	((H,C),G)	N.A.	TrN
2089	3	5677111	5678110	((H,C),G)	2.83	K80+I
2095	3	20723443	20724442	((H,G),C)	1.67	HKY
2110	3	20930151	20931150	((H,G),C)	2.97	HKY
2112	3	70512728	70513727	((H,C),G)	3.28	HKY
2118	3	74764327	74765326	((H,C),G)	6.75	HKY
2131	3	83010946	83011945	((H,C),G)	1.81	HKY
2159	3	83211631	83212630	((H,G),C)	2.34	HKY
2178	3	83415546	83416545	((H,C),G)	2.11	HKY
2196	3	83620650	83621649	((C,G),H)	1.67	HKY
2211	3	89792169	89793168	((H,C),G)	N.A.	TrN

2239	3	94708276	94709275	((H,C),G)	N.A.	TPM3uf
2246	3	95396204	95397203	((H,C),G)	1.44	HKY
2256	3	95897114	95898113	((C,G),H)	N.A.	TPM3uf
2265	3	103847850	103848849	((H,G),C)	N.A.	TPM3uf
2267	3	106069554	106070553	((H,C),G)	N.A.	TrN
2272	3	110185193	110186192	((H,C),G)	2.73	HKY
2287	3	117339812	117340811	((C,G),H)	1.34	HKY
2289	3	135672541	135673540	((C,G),H)	3.68	K80
2293	3	137217173	137218172	((H,C),G)	2.23	HKY
2308	3	144404890	144405889	((H,C),G)	N.A.	TPM1uf
2328	3	144605905	144606904	((H,C),G)	N.A.	TPM3uf
2352	3	144823203	144824202	((H,C),G)	1.46	HKY
2378	3	145091788	145092787	((H,C),G)	2.77	HKY
2402	3	145304167	145305166	((H,G),C)	N.A.	TPM3uf
2406	3	162026067	162027066	((C,G),H)	1.91	HKY
2437	3	162235127	162236126	((H,G),C)	N.A.	TPM2uf
2450	3	163764888	163765887	((H,G),C)	2.21	HKY
2454	3	164405624	164406623	((H,C),G)	1.61	HKY
2464	3	176351409	176352408	((H,C),G)	2.63	HKY
2473	4	10943393	10944392	((H,C),G)	2.21	K80
2483	4	11138281	11139280	((H,C),G)	1.27	HKY
2484	4	18247486	18248485	((H,G),C)	2.37	HKY
2487	4	18689510	18690509	((H,C),G)	N.A.	TrN
2497	4	18894844	18895843	((H,C),G)	N.A.	TPM2uf
2507	4	24114292	24115291	((H,C),G)	2.47	HKY
2539	4	30434197	30435196	((C,G),H)	1.97	HKY
2552	4	32564007	32565006	((C,G),H)	1.63	HKY
2574	4	32765487	32766486	((H,G),C)	N.A.	TPM1uf
2582	4	35175679	35176678	((H,C),G)	1.91	HKY
2595	4	45732389	45733388	((C,G),H)	4.08	HKY
2605	4	60037725	60038724	((H,C),G)	2.50	HKY
2625	4	60258127	60259126	((H,C),G)	N.A.	TPM3uf
2648	4	63695828	63696827	((H,C),G)	1.93	HKY
2665	4	63893286	63894285	((H,C),G)	2.02	HKY
2686	4	67106369	67107368	((H,C),G)	2.46	HKY
2700	4	114310805	114311804	((H,C),G)	2.02	HKY

2715	4	115347616	115348615	((H,C),G)	N.A.	TPM3uf
2725	4	124935714	124936713	((H,G),C)	2.38	HKY
2746	4	126314160	126315159	((H,G),C)	2.00	HKY
2761	4	129505308	129506307	((C,G),H)	2.88	HKY
2768	4	130169222	130170221	((H,C),G)	N.A.	TPM2uf
2784	4	160183891	160184890	((H,C),G)	N.A.	TPM1uf
2835	4	180211863	180212862	((C,G),H)	2.41	HKY
2879	5	2514990	2515989	((H,C),G)	2.62	HKY+I
2886	5	3803204	3804203	((H,C),G)	2.07	HKY
2900	5	5807182	5808181	((H,C),G)	2.85	K80
2906	5	27780120	27781119	((H,C),G)	N.A.	TPM3uf
2916	5	30631523	30632522	((H,C),G)	1.42	HKY
2939	5	30850307	30851306	((H,C),G)	2.37	HKY
2950	5	51684176	51685175	((H,C),G)	N.A.	F81
2954	5	63548670	63549669	((H,C),G)	2.09	HKY
2975	5	63751670	63752669	((C,G),H)	1.88	HKY
2976	5	84706636	84707635	((H,C),G)	2.08	HKY
2995	5	87949953	87950952	((H,C),G)	N.A.	F81
3003	5	99241732	99242731	((H,G),C)	N.A.	TPM3uf
3015	5	103813829	103814828	((H,C),G)	4.25	HKY
3023	5	105633320	105634319	((C,G),H)	1.75	HKY
3032	5	106129658	106130657	((H,C),G)	1.65	HKY
3040	5	110086427	110087426	((H,G),C)	N.A.	TPM2uf
3041	5	113824045	113825044	((H,G),C)	1.70	HKY
3046	5	119917448	119918447	((H,C),G)	1.44	HKY
3060	5	123845234	123846233	((H,C),G)	2.54	HKY
3077	5	144751618	144752617	((H,C),G)	1.73	HKY
3082	5	166598000	166598999	((C,G),H)	3.46	HKY
3093	6	9378117	9379116	((H,C),G)	2.78	HKY
3097	6	18780959	18781958	((C,G),H)	1.65	HKY
3117	6	48415235	48416234	((H,C),G)	1.34	HKY
3138	6	66315472	66316471	((C,G),H)	3.97	HKY
3160	6	66933522	66934521	((H,C),G)	2.22	HKY
3163	6	76986504	76987503	((C,G),H)	2.79	HKY
3183	6	78164459	78165458	((H,C),G)	N.A.	F81
3200	6	78390820	78391819	((C,G),H)	2.80	HKY

3204	6	80763831	80764830	((C,G),H)	1.49	HKY
3221	6	80988597	80989596	((H,C),G)	2.04	HKY
3243	6	81229063	81230062	((H,G),C)	2.20	HKY
3249	6	82578541	82579540	((H,G),C)	2.26	HKY
3263	6	90793821	90794820	((H,C),G)	2.02	HKY
3305	6	90999441	91000440	((C,G),H)	2.28	HKY
3339	6	93652222	93653221	((H,C),G)	N.A.	TPM3uf
3342	6	94649346	94650345	((H,G),C)	1.62	HKY
3358	6	94858271	94859270	((H,C),G)	1.93	HKY
3371	6	95006333	95007332	((H,C),G)	3.97	HKY
3377	6	95096367	95097366	((H,C),G)	N.A.	TPM3uf
3380	6	95106016	95107015	((H,G),C)	2.30	HKY
3384	6	95120342	95121341	((H,G),C)	N.A.	TPM3uf
3385	6	95122099	95123098	((H,C),G)	2.48	HKY
3386	6	95126619	95127618	((H,C),G)	N.A.	F81
3387	6	95128722	95129721	((H,C),G)	6.10	HKY
3393	6	95174381	95175380	((H,C),G)	1.59	HKY+I
3395	6	95186508	95187507	((H,C),G)	6.07	HKY
3396	6	95206851	95207850	((H,G),C)	N.A.	TPM1uf
3397	6	95217561	95218560	((H,C),G)	1.55	HKY
3401	6	95231796	95232795	((H,C),G)	4.05	HKY
3410	6	95276070	95277069	((H,C),G)	3.14	HKY
3415	6	101107652	101108651	((H,C),G)	1.93	HKY
3425	6	103207185	103208184	((H,C),G)	2.58	HKY
3443	6	103798086	103799085	((H,C),G)	3.04	HKY
3446	6	104226765	104227764	((H,G),C)	2.15	HKY
3473	6	104433238	104434237	((H,G),C)	N.A.	TrN
3481	6	115094761	115095760	((H,C),G)	N.A.	TPM3uf
3487	6	119549763	119550762	((H,C),G)	2.13	HKY
3515	6	119738103	119739102	((C,G),H)	4.06	HKY
3523	6	126885903	126886902	((H,G),C)	1.56	HKY
3530	6	141846722	141847721	((H,C),G)	N.A.	TPM1uf
3534	6	145061120	145062119	((H,G),C)	2.10	HKY
3546	6	156146881	156147880	((H,G),C)	2.18	K80
3556	7	41359684	41360683	((H,C),G)	2.83	HKY
3573	7	42451678	42452677	((H,C),G)	2.20	HKY

3577	7	49468643	49469642	((H,C),G)	1.63	HKY
3589	7	52474207	52475206	((H,C),G)	2.70	HKY
3625	7	52690817	52691816	((H,C),G)	N.A.	TPM3uf
3661	7	85888782	85889781	((H,G),C)	N.A.	F81
3677	7	113632664	113633663	((H,C),G)	3.41	HKY
3681	7	118671413	118672412	((H,C),G)	2.53	HKY
3683	7	125669627	125670626	((H,C),G)	N.A.	TPM2uf
3686	7	145883492	145884491	((C,G),H)	1.55	HKY
3694	8	76000407	76001406	((H,C),G)	2.94	HKY
3707	8	77781402	77782401	((H,C),G)	1.49	HKY
3727	8	83659161	83660160	((H,C),G)	N.A.	TPM1uf
3737	8	89010429	89011428	((C,G),H)	2.28	HKY
3741	8	114534601	114535600	((C,G),H)	N.A.	TPM1uf+I
3749	8	114992073	114993072	((H,G),C)	6.80	HKY+I
3761	8	141723200	141724199	((C,G),H)	2.23	HKY
3766	9	1536428	1537427	((H,C),G)	4.46	HKY
3783	9	1743015	1744014	((H,G),C)	1.71	HKY
3789	9	11850793	11851792	((H,C),G)	2.10	HKY
3794	9	13705376	13706375	((H,C),G)	4.05	HKY
3800	9	18009516	18010515	((H,C),G)	N.A.	TPM3uf
3830	9	23189453	23190452	((H,C),G)	1.59	HKY
3860	9	23412105	23413104	((H,C),G)	N.A.	F81
3863	9	24157509	24158508	((H,G),C)	N.A.	TPM3uf
3882	9	25351936	25352935	((H,G),C)	1.76	HKY
3890	9	26382945	26383944	((H,C),G)	N.A.	TrN
3896	9	30093346	30094345	((C,G),H)	2.05	HKY
3922	9	30356760	30357759	((C,G),H)	N.A.	TPM3uf
3923	9	31849777	31850776	((H,C),G)	1.65	HKY
3937	9	32044149	32045148	((H,C),G)	N.A.	TPM3uf
3955	9	74083427	74084426	((H,C),G)	1.84	HKY
3964	9	81075848	81076847	((C,G),H)	2.61	HKY
3975	9	118356705	118357704	((H,C),G)	N.A.	TPM2uf
3989	9	119729136	119730135	((C,G),H)	2.30	HKY
4019	X	7624243	7625242	((H,G),C)	2.10	HKY
4024	X	20680056	20681055	((H,C),G)	2.14	HKY
4036	X	20896970	20897969	((H,C),G)	1.92	HKY

4043	X	35320455	35321454	((H,C),G)	1.35	HKY
4050	X	66898623	66899622	((H,C),G)	1.90	HKY
4058	X	67116446	67117445	((H,C),G)	N.A.	TrN
4062	X	79697749	79698748	((H,G),C)	2.10	HKY
4066	X	82207815	82208814	((H,C),G)	2.33	HKY
4072	X	83274809	83275808	((H,C),G)	2.72	HKY
4075	X	85589655	85590654	((H,C),G)	3.80	HKY
4087	X	91096066	91097065	((H,G),C)	1.68	HKY
4110	X	98888588	98889587	((H,C),G)	2.28	HKY
4135	X	99170074	99171073	((C,G),H)	2.54	HKY
4138	X	117612134	117613133	((H,C),G)	2.46	HKY
4143	X	121580764	121581763	((H,C),G)	1.52	HKY
4149	X	122213105	122214104	((H,C),G)	N.A.	TPM3uf
4153	X	125866857	125867856	((H,C),G)	1.63	HKY
4155	X	127094708	127095707	((H,C),G)	1.78	HKY
4160	X	137895295	137896294	((H,C),G)	5.25	HKY
4177	X	138145219	138146218	((H,G),C)	2.53	HKY
4181	X	142823291	142824290	((C,G),H)	N.A.	TPM3uf
4184	X	144511738	144512737	((H,C),G)	1.53	HKY

APÊNDICE B – MANUAL DO PACOTE ALFIE

Alfie 1.0

A package for nuclear anonymous loci prediction and phylogenomic analysis using complete genomes

Igor Rodrigues da Costa
William Bryan Jennings
Francisco Prosdocimi

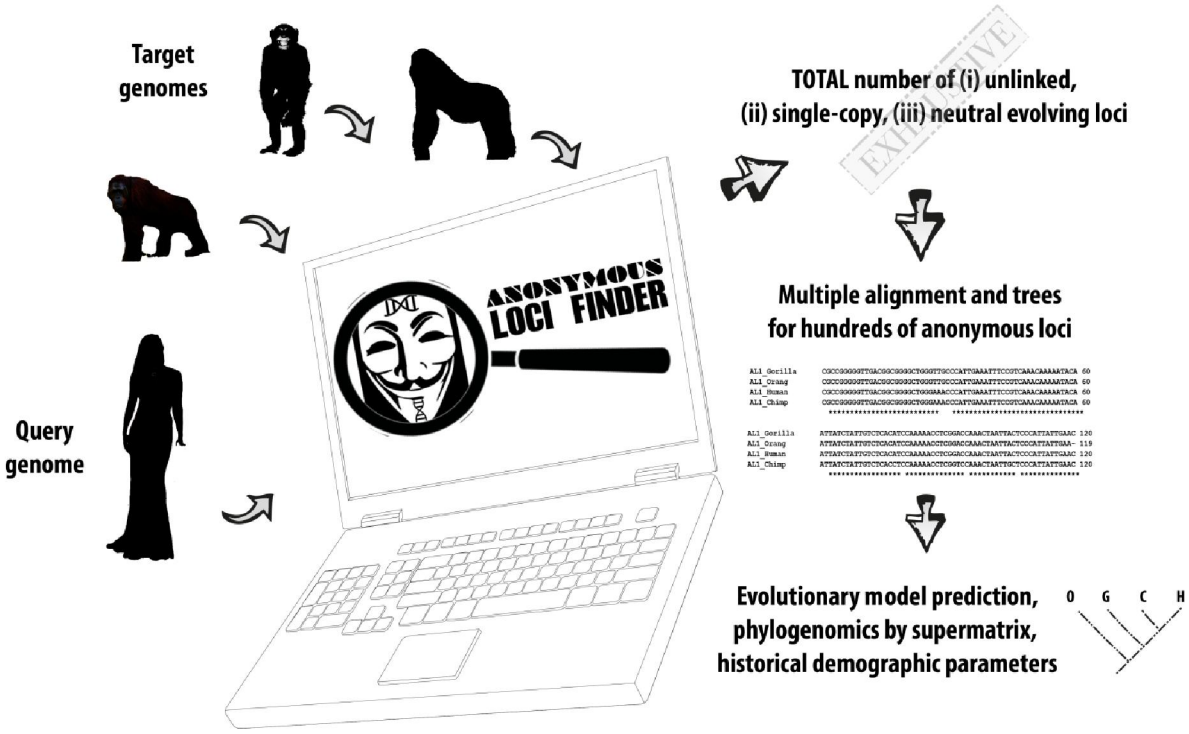
LAMPADA
LAboratório Multidisciplinar Para Análise de Dados
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis

Rio de Janeiro, 2015

1. Introduction

1.1. What is alfie?

Alfie is an open-source python package containing a pipeline that searchs for single-copy, neutral evolving and non-linked anonymous loci. In other words, it looks for non-coding loci with a set of characteristics which makes them perfect for **phylogenomics** and **populational genetic** analyses. The goal of alfie is to be a complete, user-friendly and flexible anonymous loci predictor.



1.2. How it works?

Alfie utilises a sequential modular approach, with each step of the pipeline being stored in a single module that can be excecuted with greater flexibility in standalone mode. Many of these steps require external programs, such as BLAST or CLUSTALW. To reduce the complexity of the steps the whole pipeline can be run automatically using the afie.py script.

Using as input a single query genome and its associated GTF file, alfie finds all anonymous regions distant from genomic features (>200 kb distance, by default) to avoid the effect of genetic linkage. After the initial anonymous regions have been found, they are split in small pieces (default 1 kb). Each piece is searched against subject and query genomes to filter duplications and find orthologous regions in all genomes.

Alfie performs an exhaustive search, *i. e.*, it finds every possible anonymous regions for the specified parameters in the genomes analyzed. Using default parameters and closelly related vertebrate genomes, alfie will usually find 100 - 1000 anonymous loci. Each ortholog

group of anonymous region is written in NEXUS, PHYLIP, ALN and FASTA formats. Alfie will also concatenatenate all the alignments into a large file for phylogenomic analysis. The package comes with support for running phylogenomics and population genetics software.

1.3. What to use alfie for?

Alfie was developed to find hundreds to thousands of independent, nuclear markers among whole complete genomes and facilitate population genomics studies. An usual user case would use four to ten closely related genomes (we recommend no more than 20 million years of divergence to allow precise ortholog assignment). As an example, we were able to find about 300 anonymous loci with ortologues in all four hominoid genomes used (human, chimpanzee, gorilla and orangutan).

It is strongly recommended that at least one of the genomes have been extensively studied and annotated, presenting a comprehensive GTF file that describes the precise location of the main features targeted by natural selection, such as genes and regulatory elements.

2. Installation

2.1. Downloading alfie

Users can either download and install the entire source code from github at the address https://github.com/igorrcosta/alfie/archive/master.zip or download the docker container with all the dependencies included (available soon). To install, simply extract the donwloaded repository file in a folder.

2.2. Installation requirements

Working versions for each required program can be found on the following links:

Blast: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastDocs&DOC_TYPE=Download
ClustalW: http://sourceforge.net/projects/mira-assembler/
PhyML: http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/binaries.php
ModelTest: https://code.google.com/p/jmodeltest2/
Biopython: http://biopython.org/wiki/Download

2.3. Testing your installation

You can test your installation by running alfie on the human and chimpanzee Y chromossomes' test case. To do that, go to the alfie folder and run the following command:

```
$> python alfie.py -i test/homo_y.fasta test/pan_y.fasta -g test/y.gtf
```

This command might take more than a minute to finish, depending on your computer speed. A successful run will output 42 candidate loci in the test.fasta file, of which only loci 11, 27 and 40 will be selected and aligned.

3. Quick Run

To run alfie, you will need a reference genome and gtf file (there are several available at http://www.ensembl.org/info/data/ftp/index.html) and some genomes to compare against the reference. Example command line:

```
$> python alfie.py –i *reference_genome.fasta* *genome2.fasta* *genome3.fasta* -g *annotation_file.gtf* -o *output_folder*
```

Here the *.fasta* represents the path to the genome files in FASTA format, *annotation_file.gtf* is the path to the gtf file and *output_folder* is where the loci will be saved.

This command will find several candidade loci in the reference genome, which will be stored at a test.fasta file. This candidade loci will be blasted against all genomes and the final loci will be saved in several formats.

4. Advanced parameters

While alfie can be executed with good results without any additional configuration, there are several options to flexibilize your analysis:

-i, --genomes	Path to the genome files in the FASTA format. The first genome file inserted will be considered the reference genome.
-g, --gtf	Path to the gtf file relative to the reference genome.
-o, --outpath	Path where all output files will be saved.
-f, --skip_formatdb	Skip making BLAST databases, use databses from the last run. Can significantly improve analysis speed.
--locus_length	Length of the anonymous loci (default 1000 bp). You may increase this length if you are planning to predict primers for these loci.
--max_n	Maximum percentage of N's in the AL sequence (default 0%). Increase this if you want to find more loci in a low quality reference genome.
--inter_distance	Minimum distance between ALs (defaut 200000 bp).
--gene_distance	Minimum distance between ALs and genes (default 200000 bp). You can use negative numbers to find loci close to the gene regions, for example, -2000 will find loci between 0-2000 bp from genes
--end_distance	Minimum distance between ALs and the telomeres (default 10000 bp).
--gene_locus	Use this flag to find loci inside the gene regions (will ignore the gene_distance flag).
--cds	Only considers the CDS features of GTF files, ignoring all pseudogens, miRNA, etc.
--duplication_cutoff	ALs with 2 hits with identity higher than this will be considered duplicated (default: 50%).
--identity_cutoff	ALs with a identity higher than this will be considered homologous (default: 90%).
--coverage_cutoff	BLAST hits must have at least this much %coverage to be considered hits (default: 90%).
--chromossomes	Chromossomes to be excluded. We recommend excluding all sex chromossomes.
--min_align	Minimum final alignment length (default 900 bp). This will exclude loci that have many Ns in genomes other than the reference.
--remove_gaps	Remove gaps from the final alignment.

5. Citing us

If you use this program in your analysis, please cite it as:

> Costa IR, Prosdocimi F, Jennings WB (2015). *in silico* Phylogenomics Comes of Age: Using Bioinformatic Algorithms to Discover Evolutionary Markers in Whole Genome Datasets. Manuscript in preparation.

Thank you for downloading Alfie !

APÊNDICE C – MANUSCRITO EM PREPARAÇÃO

in silico Phylogenomics Comes of Age: Using Bioinformatic Algorithms to Discover Evolutionary Markers in Whole Genome Datasets

Igor Rodrigues da Costa[1*], Francisco Prosdocimi[1*], W. Bryan Jennings[2]

[1]Laboratório de Genômica e Biodiversidade, Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

[2]Departamento de Vertebrados, Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 20940-040, Brazil.

* These authors contributed equally to this work

Abstract: The increasing availability of complete genome data for eukaryotic organisms is facilitating the acquisition of large numbers of presumably single-copy, selectively neutral, and independently assorting DNA sequence loci for coalescent-based phylogenomic analyses. Nevertheless the process of discovering these so-called “anonymous loci”, obtaining comparable sequences from other genomes, and assembling multiple sequence alignments remains piecemeal and arduous. We designed a bioinformatics algorithm that performs these tasks and outputs the datasets in ready-to-analyze formats. The utility of our algorithm is demonstrated by applying it to the hominoids. Starting with complete genome data for human, chimpanzee, gorilla, and orangutan, our algorithm found an exhaustive dataset of 300 anonymous loci, which is close to the theoretical maximum number of single copy, putatively neutral, and independently assorting loci in the human genome. Phylogenomic analyses of this dataset not only validated our algorithm by yielding a portrait of hominoid evolution consistent with previous studies, but the accuracy and precision of our estimated divergence times and ancestral effective population sizes are improved over previous studies. Complete genome *in silico* approaches such as ours will, combined with the burgeoning genome databases, accelerate the pace of phylogenomics research.

The era of using whole-genome data to reconstruct the evolutionary history of organismal clades has recently begun (*1,2*). Due to the increasing numbers of whole genome datasets that are publicly available, it is now becoming possible to target and extract hundreds or thousands of DNA sequence loci using computer-based methods for use in phylogenomic studies. Of the various types of evolutionary markers to choose from "anonymous loci" (*3*) are the preferred markers for use in coalescent-based phylogenomic studies because anonymous loci are thought to often meet three key assumptions of these analyses including: 1) each locus is single-copy in the genome, 2) each locus independently assorts relative to other loci in the sample, and 3) each locus is selectively neutral and not linked to genomic segments under selection (*4-6*). Studies that use large numbers of anonymous loci benefit because the gene trees inferred from such loci represent independent samples of the coalescent process (*7*) and therefore they can be used in statistically accurate and powerful analyses to estimate species trees, population divergence times, and ancestral population sizes (*8-10*). Recent NGS-based pipelines have greatly facilitated the process of developing novel anonymous loci (*11,12*), but the process of acquiring comparable sequences from other genomes is still time-consuming and technically challenging owing to lab-based procedures (*13*). Computer-based searches of existing genomic data represent the ideal methodology for finding and acquiring anonymous loci (*14-16*), but *in silico* approaches require complete genome sequence data, which are still unavailable for most species. However, the impending flood of complete genome sequences in coming years (*17*) will soon permit researchers to not only use *in silico* approaches to find large numbers of anonymous loci in non-model organisms, but also to extract comparable sequences from other genomes, perform multiple sequence alignments, and produce a single ready-to-analyze data file in mere minutes or hours instead of weeks or months.

We have developed a bioinformatics-based method that performs the serial tasks of anonymous loci data acquisition in a completely *in silico* fashion. Required input data files includes: complete genome sequence data in FASTA format for each individual or species and one GFF file containing the chromosomal coordinates for all known protein-coding genes, regulatory elements, RNAs, and other annotated genomic elements in the genome used as query. Both genome and GFF files are readily available in databases such as ENSEMBL. The algorithm's first step is to map the intergenic sequences (i.e., anonymous regions) while discarding all sequences with known functions plus their genetically linked, flanking regions (fig. 1a). The length of the flanking regions should be long enough to decouple the anonymous DNA from protein-coding, regulatory, or other genomic elements with known functions because sites that are linked to functional regions can experience indirect selection and therefore may not satisfy the assumption of selective neutrality (*18,19*). The intergenic regions are of interest for anonymous loci development because, evidently, most vertebrate genomes contain vast amounts (> 90%) of apparently non-functional DNA (*20,21*) ,which is believed to be selectively neutral (*22*). To complete the first step, the anonymous regions are cut into consecutive segments (here we used 1Kb long fragments), which we termed "candidate anonymous loci" (fig. 1a). In the second step, the algorithm uses the candidate anonymous loci as query sequences to conduct a BLAST search *(23)* against other target genomes in order to find orthologous copies of each candidate anonymous locus. The program only retains the candidate anonymous loci present as a single copy in each sampled genome and saves all sequences in a FASTA file (fig. 1b). In the third step, the algorithm retrieves the FASTA sequences, conducts multiple sequence alignments for all candidate anonymous loci (*24*), and excludes anonymous loci that may be linked to one another (fig. 1c). Anonymous loci should be spaced far enough apart on a chromosome to be considered statistically uncorrelated from other anonymous loci. In humans, the minimum distance

between unlinked sites located on the same chromosome can be assumed to be around 200 kb (*25*). After this selection step, the candidate anonymous loci are considered ideal anonymous loci because they are presumably single-copy, selectively neutral, and unlinked. The pipeline finishes by producing the following output files (in FASTA, NEXUS, and PHYLIP formats): one file containing the entire anonymous loci dataset with all multiple sequence alignments; one file containing all concatenated loci with the sequences aligned (i.e., "supermatrix"); and individual files corresponding to each anonymous locus multiple sequence alignment.

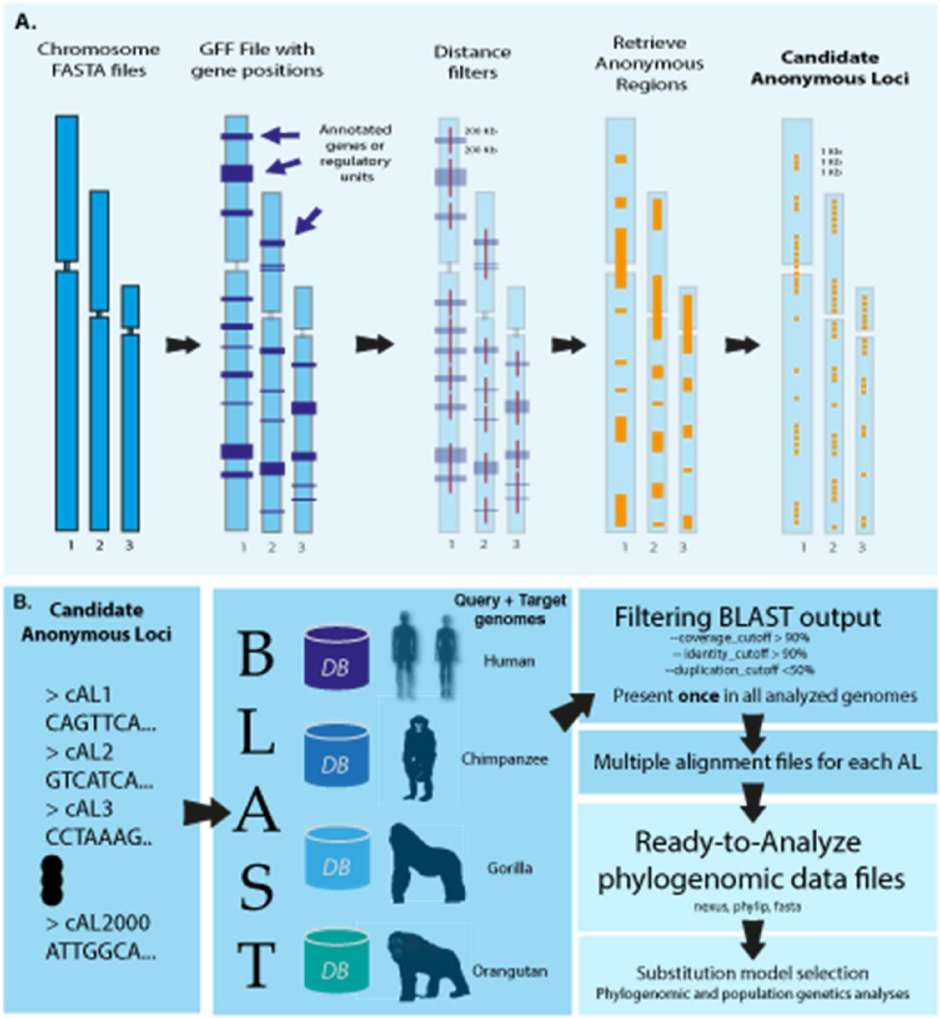


Figure 1.

We validated our anonymous loci acquisition algorithm using hominoid genome data. Not only are complete genome data available for each of the major hominoid lineages (i.e., human, chimpanzee, gorilla, and orangutan), but the evolutionary history of this group has been intensively studied and thus this system is ideal for evaluating the performance of our algorithm. Using the annotated human genome data, the anonymous loci algorithm required about 3 hours to generate a dataset consisting of 300 hominoid anonymous loci (table S1). As expected, the anonymous loci were scattered randomly across the human genome (fig. 2). Given the sizes of the hominoid genomes, this maximum number of anonymous loci might appear low. To estimate the theoretical maximum number of independently assorting loci that exist in the human genome, we conducted an analysis following (*26;* see Materials and Methods). If we assume that the effective population size of modern humans is between 7,500 (*27*) and 10,000 (*28*), then there are an estimated ~1000 to 1400 statistically uncorrelated loci in the human genome. If we were to exclude the loci that are not single-copy and which are either under direct natural selection or which are linked to sites in the genome under such selection, then the maximum number of single-copy and presumably neutral loci in the human genome is likely to be in the hundreds and not thousands. Our hypothesis is corroborated by the automated *in silico* based results herein and the manual *in silico* based study of (*15*).

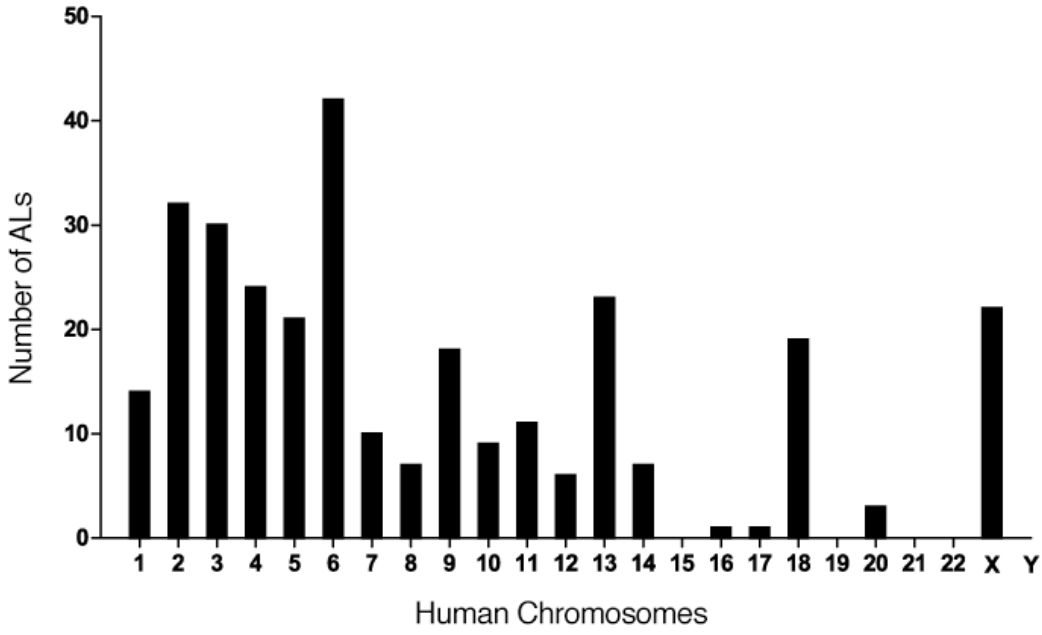


fig. 2. Histogram of AL distribution in human chromosomes.

Phylogenetic analyses of each anonymous locus generated a distribution of 300 rooted gene trees of which 64% (**193**/300) displayed the expected topology of a human-chimpanzee sister group relationship (table S2; *14,29*). These results constitute strong evidence based on the majority-rule criterion that we recovered the correct hominoid species tree (*30*). Moreover, our finding of the equally frequent alternative topologies (~20% each) also matches the expectations of coalescent theory (*7*,*30*) and previous empirical results (*14*).

Interestingly, despite 88 different DNA substitution models available in model testing procedure (see Materials and Methods), a single substitution model, the HKY85 model (*31*), best explains 70% (210/300) of our anonymous loci (fig. 3; table S3). It is not surprising that this model with its assumed unequal equilibrium base frequencies was so frequently chosen because the human genome is known to have a GC content of 41% (*22*). None of the models included the invariant sites or gamma parameters for among-site rate heterogeneity. Perhaps if the sites in our presumably neutral anonymous loci have been free of any functional

constraints, then we would not expect to see significant among site rate variation. These results suggest that neutral intergenic sites may have a single mode of molecular evolution in the human genome that is characterized by simple transition-transversion rate differences (average ti/tv = 2.3±0.9; fig 4). If these results are confirmed in other comparable genomes, then we predict that phylogenomic results obtained from datasets consisting of hundreds or more anonymous loci will not substantially differ whether a single substitution model is used or each anonymous locus has its own specific model.

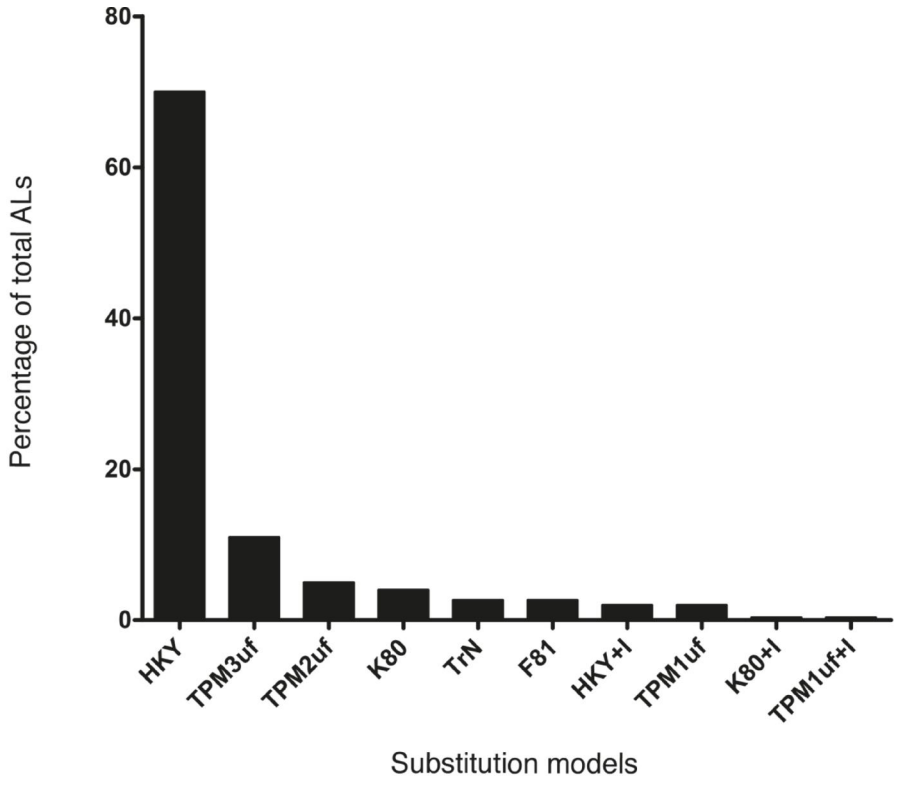


Figure 3.

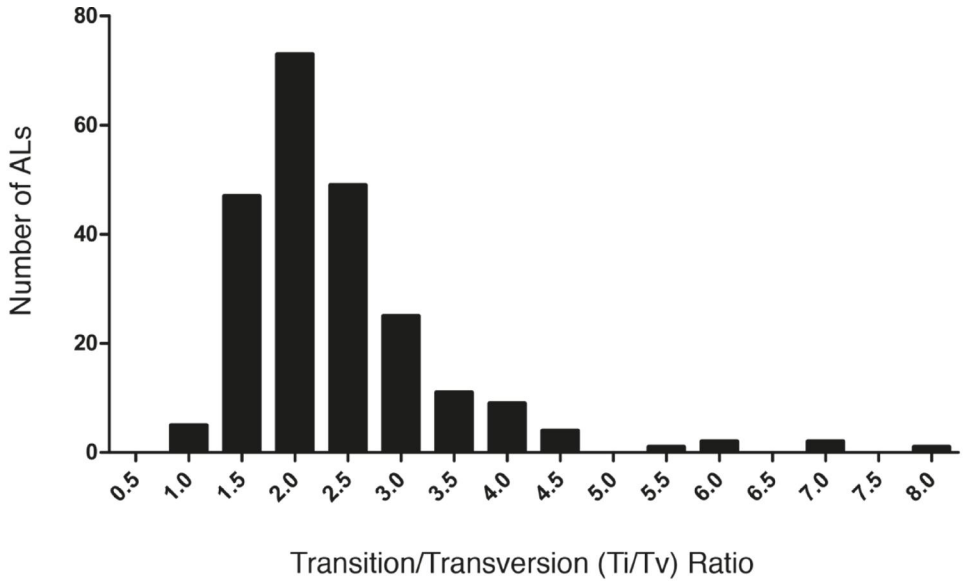


Figure 4.

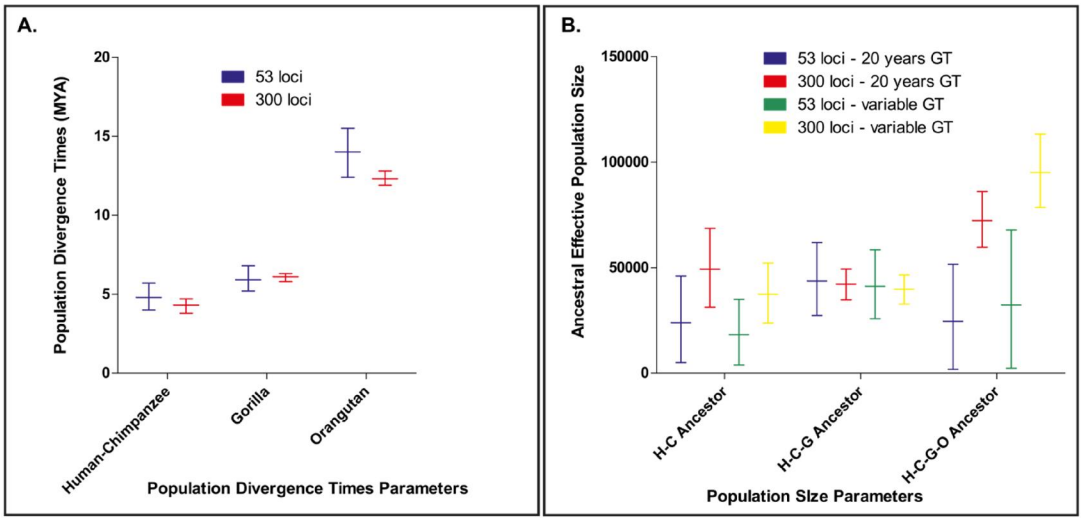


Figure 5.

Historical demographic parameter estimates between the 53 (*14*) and 300 (this work) locus datasets were largely in agreement thereby providing additional evidence that our algorithm performed as expected (fig. 4). The 300 locus-estimate places the human vs. chimpanzee and the orangutan divergences 0.5 and 1.8 million years (my) more recent, respectively, than the comparable estimates from the 53 locus-data (fig. 4a). All estimates for

the gorilla divergence suggest this event took place about 6 my ago. The most dramatic, but not unexpected, results concern the width of the 95% Bayesian credibility intervals (C.I.). The 95% C.I. for the 300 locus-estimates were two-fold narrower for the human-chimpanzee divergence and three-fold smaller for the other two divergence time estimates (fig. 4a). The 300 locus-estimates for ancestral population size of the human and chimpanzee lineage ranged from 37,000-50,000 depending on the assumed generation time, while the 53 locus-estimates produced estimates of 17,000-23,000 (fig. 4b). Estimates for the ancestral population size for the human-chimpanzee-gorilla lineage were similar as they ranged between 40,000-43,000 (fig. 4b). The estimated ancestral population sizes for the hominoids considerably differed depending on dataset with the larger dataset producing estimates as high as 72,000-95,000 and the smaller dataset yielding much smaller values in the range of 21,000-33,000 (fig. 4b). The C.I.s for the human-chimpanzee ancestral population size were all quite large and did not vary according to numbers of loci, but the other two population size estimates showed two-fold reductions of their C.I.s in the estimates from the 300 locus data (fig. 4b). All parameter estimates were insensitive to choice of priors (fig. 4, fig. S2.).

A current projection (*17*) suggests that if the recent growth rate in the numbers of sequenced vertebrate genomes holds (10X/5 years), then we can expect at least 10,000 sequenced vertebrate genomes in 5-10 years. Bioinformatics algorithms like the one presented here will be needed to meet the challenge of this surge in available genomes. Comparative analyses of our 300 locus hominoid dataset vs. the 53 locus dataset of (*14*) generated concordant results thereby validating our algorithm. We also observed two- to three-fold reductions in the confidence intervals around our demographic parameter estimates compared to the 53 locus data of (*14*). This finding is significant because it provides the strongest evidence yet to corroborate previous theoretical-simulation (*8,10*) and empirical (*9,19*) studies concerning the inverse relationship between numbers of unlinked loci vs. the accuracy and

precision of estimated historical demographic parameters. Such dramatic increases in the precision of divergence time estimates, in particular, may be critically important for testing biogeographic hypotheses. Owing to the quantity and quality of our chosen loci as well as methods of analysis, which also incorporated recent improved estimates for the ancestral generation times in the hominoids (*29*), the new estimates of population divergence times and ancestral population sizes presented here likely provide the most accurate and precise view of hominoid phylogenomic history to date.

References and Notes

1. Alföldi, J., Di Palma, F., Grabherr, M., Williams, C., Kong, L., Mauceli, E., ... & Lindblad-Toh, K. (2011). The genome of the green anole lizard and a comparative analysis with birds and mammals. *Nature*, *477*(7366), 587-591.

2. Jarvis, E. D., Mirarab, S., Aberer, A. J., Li, B., Houde, P., Li, C., ... & Samaniego, J. A. (2014). Whole-genome analyses resolve early branches in the tree of life of modern birds. *Science*, *346*(6215), 1320-1331.

3. Karl, S. A., & Avise, J. C. (1993). PCR-based assays of mendelian polymorphisms from anonymous single-copy nuclear DNA: techniques and applications for population genetics. *Molecular Biology and Evolution*, *10*(2), 342-361.

4. Brito, P. H., & Edwards, S. V. (2009). Multilocus phylogeography and phylogenetics using sequence-based markers. *Genetica*, *135*(3), 439-455.

5. Thomson, R.C., Wang, I.J., Johnson, J.R. (2010). Genome-enabled development of DNA markers for ecology, evolution, and conservation. *Molecular Ecology* 19:2184–2195.

6. Reilly, S. B., Marks, S. B., & Jennings, W. B. (2012). Defining evolutionary

boundaries across parapatric ecomorphs of Black Salamanders (*Aneides flavipunctatus*) with conservation implications. *Molecular ecology*, *21*(23), 5745-5761.

7. Wakeley, J. (2009). *Coalescent theory: an introduction* (Vol. 1). Greenwood Village, Colorado: Roberts & Company Publishers.

8. Pluzhnikov, A., & Donnelly, P. (1996). Optimal sequencing strategies for surveying molecular genetic diversity. *Genetics*, *144*(3), 1247-1262.

9. Jennings, W.B., Edwards, S.V. (2005). Speciational history of Australian Grass Finches (*Poephila*) inferred from thirty gene trees. *Evolution* 59:2033–2047.

10. Felsenstein, J. (2006). Accuracy of coalescent likelihood estimates: do we need more sites, more sequences, or more loci?. *Molecular biology and evolution*, *23*(3), 691-700.

11. Bertozzi, T., Sanders, K.L., Sistrom, M.J., Gardner, M.G. 2012. Anonymous nuclear loci in non-model organisms: making the most of high throughput genome surveys. *Bioinformatics*.

12. Lemmon, A.R., & Lemmon, E.M. (2012). High-throughput identification of informative nuclear loci for shallow-scale phylogenetics and phylogeography. *Systematic Biology*.

13. Lemmon, E. M., & Lemmon, A. R. (2013). High-throughput genomic data insystematics and phylogenetics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, *44*, 99-121.

14. Chen, F. C., & Li, W. H. (2001). Genomic divergences between humans and other hominoids and the effective population size of the common ancestor of humans and chimpanzees. *The American Journal of Human Genetics*, *68*(2), 444-456.

15. Peng, Z., Elango, N., Wildman, D. E., & Soojin, V. Y. (2009). Primate

phylogenomics: developing numerous nuclear non-coding, non-repetitive markers for ecological and phylogenetic applications and analysis of evolutionary rate variation. *BMC genomics*, *10*(1), 247.

16. Wenzel, M. A., & Piertney, S. B. (2015) In silico identification and characterisation of 17 polymorphic anonymous non-coding sequence markers (ANMs) for red grouse (*Lagopus lagopus scotica*). *Conservation Genetics Resources*, 1-5.

17. O'Brien, S. J., Haussler, D., & Ryder, O. (2014). The birds of Genome10K. *GigaScience*, *3*(1), 32.

18. Kaplan, N. L., Hudson, R. R., & Langley, C. H. (1989). The "hitchhiking effect" revisited. *Genetics*, *123*(4), 887-899.

19. Lee, J.Y., Edwards, S.V. (2008). Divergence across Australia's Carpentarian barrier: statistical phylogeography of the red-backed fairy wren *Malurus melanocephalus*. *Evolution* 62:3117–3134.

20. Meader, S., Ponting, C.P., Lunter, G. (2010). Massive turnover of functional sequence in human and other mammalian genomes. *Genome Research* 20:1335 1343.

21. Ponting, C.P., Hardison, R.C. (2011). What fraction of the human genome is functional? *Genome Research* 21:1769–1776.

22. Graur, D., Zheng, Y., & Azevedo, R. B. (2015). An evolutionary classification of genomic function. *Genome biology and evolution*, *7*(3), 642-645.

23. Camacho C., Coulouris G., Avagyan V., Ma N., Papadopoulos J., Bealer K., & Madden T.L. (2008). BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10:421.

24. Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., & Higgins, D. G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23 (21), 2947-2948

25. Sachidanandam, R., Weissman, D., Schmidt, S. C., Kakol, J. M., Stein, L. D., Marth, G.,... & Altshuler, D. (2001). A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*, *409*(6822), 928-933.

26. Hudson, R. R., & Coyne, J. A. (2002). Mathematical consequences of the genealogical species concept. *Evolution*, *56*(8), 1557-1565.

27. Tenesa, A., Navarro, P., Hayes, B. J., Duffy, D. L., Clarke, G. M., Goddard, M. E., & Visscher, P. M. (2007). Recent human effective population size estimated from linkage disequilibrium. *Genome research*, *17*(4), 520-526.

28. Takahata, N. (1993). Allelic genealogy and human evolution. *Molecular Biology and Evolution*, *10*(1), 2-22.

29. Schrago, C. G. (2014). The effective population sizes of the anthropoid ancestors of the human–chimpanzee lineage provide insights on the historical biogeography of the great apes. *Molecular biology and evolution*, *31*(1), 37-47.

30. Degnan, J. H., & Rosenberg, N. A. (2009). Gene tree discordance, phylogenetic inference and the multispecies coalescent. *Trends in ecology & evolution*, *24*(6), 332-340.

31. Hasegawa, M., Kishino, H., & Yano, T. A. (1985). Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of molecular evolution*, *22*(2), 160-174.

32. Cock, P. J., Antao, T., Chang, J. T., Chapman, B. A., Cox, C. J., Dalke, A., Friedberg, I., Hamelryck, T., Kauff, F., Wilczynski, B., & de Hoon, M. J. (2009). Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. *Bioinformatics*, 25(11), 1422-1423.

List of Figures

Supplemental Figure

Supplemental Tables

Materials and Methods

Our software was named alfie package and is available at https://github.com/igorrcosta/alfie. It was developed in Python 2.7 using the Biopython library (*32*). Alfie is a package containing several Python scripts that work together to predict anonymous loci in complete genomes. The alfie.py script encapsulates all functions in an easy to use command line interface.

Although there are many options and configurations available for the advanced user, the program only requires 2 or more genome files and a file with gene annotations. A standard run will follow these steps:

1) Find regions in the reference genome that are far from functional regions;
2) Split those regions into candidate anonymous loci;
3) Filter loci that are not single-copy in all genomes;
4) Align the loci from all genomes.

The search in step 3 and the alignment in step 4 use the BLAST+ (*23*) and the CLUSTALW (*24*) programs respectively. Additionally, the package includes scripts for phylogenetic analysis, substitution model prediction, loci chromosomal distribution and PCR primer design. A complete manual explaining the program usage is available at https://github.com/igorrcosta/alfie/manual.pdf.

Referências

1. Kuska, B., *Beer, Bethesda, and biology: how "genomics" came into being.* J Natl Cancer Inst, 1998. **90**(2): p. 93.
2. *Genome 10K: a proposal to obtain whole-genome sequence for 10,000 vertebrate species.* J Hered, 2009. **100**(6): p. 659-74.
3. Schuster, S.C., *Next-generation sequencing transforms today's biology.* Nat Methods, 2008. **5**(1): p. 16-8.
4. Mardis, E.R., *A decade's perspective on DNA sequencing technology.* Nature, 2011. **470**(7333): p. 198-203.
5. Koboldt, D.C., et al., *Challenges of sequencing human genomes.* Brief Bioinform, 2010. **11**(5): p. 484-98.
6. Brown, G.R., et al., *Gene: a gene-centered information resource at NCBI.* Nucleic Acids Res, 2015. **43**(Database issue): p. D36-42.
7. Federhen, S., *The NCBI Taxonomy database.* Nucleic Acids Res, 2012. **40**(Database issue): p. D136-43.
8. Pruitt, K.D., et al., *NCBI Reference Sequences (RefSeq): current status, new features and genome annotation policy.* Nucleic Acids Res, 2012. **40**(Database issue): p. D130-5.
9. Flicek, P., et al., *Ensembl 2014.* Nucleic Acids Res, 2014. **42**(Database issue): p. D749-55.
10. Takahata, N., Y. Satta, and J. Klein, *Divergence time and population size in the lineage leading to modern humans.* Theor Popul Biol, 1995. **48**(2): p. 198-221.
11. Ruvolo, M., *Molecular phylogeny of the hominoids: inferences from multiple independent DNA sequence data sets.* Mol Biol Evol, 1997. **14**(3): p. 248-65.
12. Chen, F.C. and W.H. Li, *Genomic divergences between humans and other hominoids and the effective population size of the common ancestor of humans and chimpanzees.* Am J Hum Genet, 2001. **68**(2): p. 444-56.
13. Horai, S., et al., *Man's place in Hominoidea revealed by mitochondrial DNA genealogy.* J Mol Evol, 1992. **35**(1): p. 32-43.
14. Bailey, W.J., et al., *Molecular evolution of the psi eta-globin gene locus: gibbon phylogeny and the hominoid slowdown.* Mol Biol Evol, 1991. **8**(2): p. 155-84.
15. Takahata, N., *A simple genealogical structure of strongly balanced allelic lines and trans-species evolution of polymorphism.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(7): p. 2419-23.
16. Rogers, A.R. and H. Harpending, *Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences.* Mol Biol Evol, 1992. **9**(3): p. 552-69.
17. Jeffreys, A.J., V. Wilson, and S.L. Thein, *Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA.* Nature, 1985. **314**(6006): p. 67-73.
18. Ahmadian, A., et al., *Single-nucleotide polymorphism analysis by pyrosequencing.* Anal Biochem, 2000. **280**(1): p. 103-10.
19. Rands, C.M., et al., *8.2% of the Human genome is constrained: variation in rates of turnover across functional element classes in the human lineage.* PLoS Genet, 2014. **10**(7): p. e1004525.

20. Jennings, W.B. and S.V. Edwards, *Speciational history of Australian grass finches (Poephila) inferred from thirty gene trees.* Evolution, 2005. **59**(9): p. 2033-47.
21. Lee, J.Y. and S.V. Edwards, *Divergence across Australia's Carpentarian barrier: statistical phylogeography of the red-backed fairy wren (Malurus melanocephalus).* Evolution, 2008. **62**(12): p. 3117-34.
22. Gottscho, A.D., S.B. Marks, and W.B. Jennings, *Speciation, population structure, and demographic history of the Mojave Fringe-toed Lizard (Uma scoparia), a species of conservation concern.* Ecol Evol, 2014. **4**(12): p. 2546-62.
23. Jarne, P. and P.J. Lagoda, *Microsatellites, from molecules to populations and back.* Trends Ecol Evol, 1996. **11**(10): p. 424-9.
24. Bertozzi, T., et al., *Anonymous nuclear loci in non-model organisms: making the most of high-throughput genome surveys.* Bioinformatics, 2012. **28**(14): p. 1807-10.
25. Cock, P.J., et al., *Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics.* Bioinformatics, 2009. **25**(11): p. 1422-3.
26. Camacho, C., et al., *BLAST+: architecture and applications.* BMC Bioinformatics, 2009. **10**: p. 421.
27. Guindon, S. and O. Gascuel, *A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood.* Syst Biol, 2003. **52**(5): p. 696-704.
28. Thompson, J.D., T.J. Gibson, and D.G. Higgins, *Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX.* Curr Protoc Bioinformatics, 2002. **Chapter 2**: p. Unit 2 3.
29. Posada, D. and K.A. Crandall, *MODELTEST: testing the model of DNA substitution.* Bioinformatics, 1998. **14**(9): p. 817-8.
30. Posada, D., *jModelTest: phylogenetic model averaging.* Mol Biol Evol, 2008. **25**(7): p. 1253-6.
31. Hasegawa, M., H. Kishino, and T. Yano, *Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA.* J Mol Evol, 1985. **22**(2): p. 160-74.
32. Degnan, J.H. and N.A. Rosenberg, *Gene tree discordance, phylogenetic inference and the multispecies coalescent.* Trends Ecol Evol, 2009. **24**(6): p. 332-40.
33. Rannala, B. and Z. Yang, *Bayes estimation of species divergence times and ancestral population sizes using DNA sequences from multiple loci.* Genetics, 2003. **164**(4): p. 1645-56.
34. Yang, Z. and B. Rannala, *Bayesian species delimitation using multilocus sequence data.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(20): p. 9264-9.
35. Hobolth, A., et al., *Genomic relationships and speciation times of human, chimpanzee, and gorilla inferred from a coalescent hidden Markov model.* PLoS Genet, 2007. **3**(2): p. e7.