



UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM SISTEMAS DE INFORMAÇÃO

MAURICIO SOUZA MENEZES

FERRAMENTA COMPUTACIONAL PARA ESTUDO DA EVOLUÇÃO DE ESPÉCIES
VIRAIS BASEADO NO USO DE CÓDONS

SALVADOR

2023

MAURICIO SOUZA MENEZES

FERRAMENTA COMPUTACIONAL PARA ESTUDO DA EVOLUÇÃO DE ESPÉCIES
VIRAIS BASEADO NO USO DE CÓDONS

Monografia apresentada ao curso de Sistemas de Informação do Departamento de Ciências Exatas e da Terra da Universidade do Estado da Bahia - UNEB, como requisito parcial à obtenção do grau de bacharel em Sistemas de Informação. Área de Concentração: Ciência da Computação

Orientador: PhD Diego Gervasio Frias Suárez

Coorientador: PhD Vagner Fonseca

SALVADOR

2023

Termo de Anuência do Orientador

Declaro para os devidos fins que li e revisei este trabalho e atesto sua qualidade como resultado final desta monografia. Confirmo que o referencial teórico apresentado é completo e suficiente para fundamentar os objetivos propostos e que a metodologia científica utilizada e os resultados finais são consistentes e com qualidade suficiente para submissão à banca examinadora final do Trabalho de Conclusão de Curso II do curso de Bacharelado em Sistemas de Informação.

PhD Diego Gervasio Frias Suárez

MAURICIO SOUZA MENEZES

FERRAMENTA COMPUTACIONAL PARA ESTUDO DA EVOLUÇÃO DE ESPÉCIES
VIRAIS BASEADO NO USO DE CÓDONS

Monografia apresentada ao curso de Sistemas de Informação do Departamento de Ciências Exatas e da Terra da Universidade do Estado da Bahia - UNEB, como requisito parcial à obtenção do grau de bacharel em Sistemas de Informação. Área de Concentração: Ciência da Computação

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

PhD Diego Gervasio Frias Suárez (Orientador)
Universidade do Estado da Bahia – UNEB

PhD Vagner Fonseca (Coorientador)
Universidade do Estado da Bahia – UNEB

Dedico este trabalho, com muito amor, a minha
rainha, Miriam Souza Menezes

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e por me guiar nos caminhos certos; Agradeço aos meus pais, Mauricio Porto e Miriam Souza, pela criação e por todo o apoio que me deram; Agradeço também ao meu irmão, Maurílio Souza (mesmo sem merecer. . .) por torrar paciência; Agradeço a minha namorada, Yasmim Arrais, por todo o apoio, conversas e momentos em que me tranquilizou; Agradeço ao meu orientador, Diego Frias, pela amizade, paciência e atenção dada. Agradeço a todos os colegas de curso, em especial aos amigos Joílson Argolo e Marcelo Henrique, que estiveram sempre próximos durante toda essa caminhada. Agradeço ao meu amigo, Alexandre Aquiles, por me ensinar ainda mais, que ajudar ao próximo é essencial em todos os momentos da nossa vida.

RESUMO

Este trabalho tem como objetivo principal o desenvolvimento de um modelo para a análise de genomas virais, baseado no uso de códons. Essa ferramenta se propõe a ser uma importante ferramenta para a análise da evolução de espécies, utilizando sequências genômicas do SARS-COV-2 como base de estudo. A implementação desse modelo visa proporcionar maior eficiência computacional e alcançar resultados mais precisos. Adicionalmente, a ferramenta será capaz de apresentar visualizações gráficas dos resultados obtidos, facilitando a interpretação dos dados e auxiliando na tomada de decisões científicas. Espera-se que essa abordagem proporcione insights valiosos sobre a evolução de espécies virais, contribuindo para o avanço da virologia e da genômica comparativa. Os resultados obtidos serão analisados com o objetivo de demonstrar a eficácia dessa ferramenta na compreensão dos padrões evolutivos em espécies virais, tornando-a uma promissora aliada para pesquisadores e profissionais da área.

Palavras-chave: Bioinformática; Códons; Filogenia; Viral.

ABSTRACT

This work aims to develop a model for the analysis of viral genomes based on the use of codons, which will serve as a tool for studying the evolution of species using genomic sequences of SARS-CoV-2. It is expected that this approach will enable a more efficient computational process and yield improved results. Additionally, the tool will provide graphical visualization of the results, facilitating data interpretation and supporting scientific decision-making. Through the application of this tool, valuable insights into the evolution of viral species are anticipated, contributing to advancements in virology and comparative genomics. The obtained results are expected to demonstrate the effectiveness of the tool in analyzing and understanding evolutionary patterns in viral species, making it a promising resource for researchers and professionals in the field.

Keywords: Bioinformatics; Codons; Phylogeny; Viral.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura do DNA.	18
Figura 2 – Tabela de Códon.	20
Figura 3 – Estrutura do coronavírus.	22
Figura 4 – Processo iterativo da metodologia Design Science Research (DSR).	29
Figura 5 – Pipeline de Download das Sequências Genômicas.	31
Figura 6 – Dataset de sequências genômicas.	32
Figura 7 – Pipeline de Filtragem de Sequências Genômicas Duplicadas.	33
Figura 8 – Pipelines descontinuado.	34
Figura 9 – Pipeline de Alinhamento de Sequências Genômicas Duplicadas.	35
Figura 10 – Pipeline de Extração do Gene Spike das Sequências Genômicas Alinhadas.	35
Figura 11 – Pipeline de Filtragem de Sequências Genicas Duplicadas.	35
Figura 12 – Pipeline de Filtragem de Sequências Genicas de Má Qualidade.	36
Figura 13 – Arquivos de Entrada do AGUA.	36
Figura 14 – Arquivos de entrada do AGUA e do IQ-TREE.	38
Figura 15 – Árvore Filogenética Construída com o IQ-TREE.	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– <i>IUPAC Nucleotide Code.</i>	19
Tabela 2	– <i>Nomenclaturas (Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak Lineages) (PANGO) e Organização Mundial da Saúde (World Health Organization) (WHO).</i>	25
Tabela 3	– Informações do dataset de sequências genômicas.	33
Tabela 4	– Informações do dataset de teste de sequências genômicas.	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	adenina
AGUA	<i>Ad hoc Genotyping with Unsupervised</i>
BV-BRC	Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center
C	citossina
COVID-19	<i>Coronavirus Disease 2019</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DSR	Design Science Research
G	guanina
GB	Gigabyte
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada (<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
MB	Megabyte
ML	Máxima Verossimilhança
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro (<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NGS	Sequenciamento de Nova Geração (<i>Next-generation Sequence</i>)
PANGO	(<i>Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak Lineages</i>)
RNA	Ácido Ribonucleico (<i>Ribonucleic Acid</i>)
SARS-CoV-2	Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i>)
T	timina
tRNA	Ácido Ribonucleico Transportador (<i>Transporter Ribonucleic Acid</i>)
WHO	Organização Mundial da Saúde (<i>World Health Organization</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1	Biologia Molecular	17
2.2	Vírus	21
2.2.1	SARS-CoV-2	21
2.3	Bioinformática	23
2.4	Filogenia	23
2.4.1	Nomenclaturas de Linhagens do SARS-CoV-2	24
2.5	Machine Learning	25
2.6	Trabalhos Correlatos	26
3	DESCRIÇÃO DO PROJETO	28
3.1	Metodologia	28
3.2	Materiais e Métodos	29
3.3	Plano de Implementação	30
3.3.1	Montagem e Preparação do Dataset	31
3.3.2	AGUA	37
3.3.3	Análise comparativa entre o método proposto (AGUA) e outro método existente	37
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
	REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

Os problemas impostos pela pandemia do novo coronavírus (do inglês *Coronavirus Disease 2019* (COVID-19)) incluíram a falta de conhecimento suficiente para a compreensão da importância das ameaças biológicas e para a preparação médica, apesar dos avanços científicos e tecnológicos já alcançados na área em questão(1). Em vista disso, o conhecimento prévio sobre os agentes biológicos com potencial para causar pandemias, tem o poder de melhorar substancialmente uma preparação pré-pandemia (2).

Dentre esses desafios, o Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*) (SARS-CoV-2) emergiu como o patógeno de maior prioridade entre 2020 e 2023, devido à sua alta transmissibilidade e a ausência de medidas eficazes. A limitação do conhecimento sobre a epidemiologia, imunidade e patogênese do vírus destacou a necessidade de aprimorar a biossegurança e expandir a capacidade dos laboratórios e profissionais de saúde (3, 4, 5, 6). Com mais de 771 milhões de casos confirmados e quase 7 milhões de mortes globalmente, sendo mais de 193 milhões de casos e quase 3 milhões de mortes concentrados nas Américas(7), ações intergovernamentais foram estabelecidas para responder à pandemia e controlar a transmissão do vírus.

Diante desse cenário, a bioinformática, que é a junção de métodos computacionais e técnicas estatísticas com o objetivo de extrair informações de dados biológicos brutos, desempenha um papel fundamental na interpretação de dados genômicos e na compreensão de processos evolutivos(8). Juntamente com a análise genética, é uma especialidade crucial na compreensão da diversidade e evolução de vírus que podem afetar organismos, incluindo seres humanos, animais e plantas. Essa análise não apenas fornece *insights* sobre a classificação e identificação de vírus, mas também é fundamental para a pesquisa em saúde pública, agronegócio e ecologia. No entanto, a complexidade inerente às sequências genéticas dos vírus e a crescente disponibilidade de dados genômicos desafiam a capacidade de análise humana (9, 10).

A reconstrução filogenética é uma das abordagens amplamente utilizadas na análise da evolução de espécies, que permite investigar as relações evolutivas entre diferentes linhagens de vírus (11, 12). Essas observações são realizadas com base em dados como sequências de

Ácido Desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic Acid*) (DNA) e Ácido Ribonucleico (*Ribonucleic Acid*) (RNA). Essas sequências são formadas por blocos fundamentais chamados de nucleotídeos, que são compostos por uma base nitrogenada, um açúcar e um grupo fosfato. As bases presentes nos nucleotídeos do DNA são adenina (A), timina (T), citosina (C) e guanina (G), enquanto no RNA a base timina é substituída pela uracila (U) (13, 14). Segundo Hall e Barlow os métodos filogenéticos podem ser usados para analisar os dados da sequência de nucleotídeos de forma que a ordem de descendência de cepas relacionadas possa ser determinada. Quando associada à análise filogenética apropriada, a epidemiologia molecular tem o potencial de elucidar os mecanismos que levam a surtos microbianos e epidemias.

Uma das principais formas de análise filogenética é realizada através da árvore filogenética, onde são representadas as relações evolutivas entre um conjunto de espécies. De acordo com Morrison elas tem função importante porque apresentam de forma sucinta e particular a evolução dos descendentes partindo de ancestrais em comum.

Seguindo a linha dos métodos até então desenvolvidos, este trabalho busca tentar desenvolver um método de construção de árvores com base nas distâncias obtidas a partir da diferença do uso de códons, e assim poder contribuir com a tarefa de classificação de cepas para entes responsáveis por controles voltados a áreas da saúde, como por exemplo a vigilância sanitária, especialmente na descoberta de novas cepas emergentes com potenciais pandêmicos. Ademais, é também importante dispor de alternativas à filogenia molecular atualmente utilizada, para gerar informações de outro ponto de vista e-ou para servir de referência aos métodos filogenéticos (17).

Os métodos atuais ainda demandam de um alto custo computacional, devido principalmente a quantidade de dados a serem tratados, sendo assim, existe a necessidade de desenvolver outros mais baratos e que possam suportar o volume crescente de dados (sequências). Sendo assim, o projeto visa apresentar um método que seja capaz de realizar classificações, com um custo computacional baixo, em relação a outros métodos, e que possa apresentar, do ponto de vista científico, alternativas de comparação com outras técnicas já existentes (18, 19). A hipótese referente à menor complexidade computacional do novo método deverá ser testada no trabalho.

A semelhança genética entre vários vírus infecciosos e mortais fornece uma visão do fato de que o RNA é a chave para discernir e marcar os possíveis patógenos que podem causar uma pandemia. Embora um padrão geral e motivos conservados possam ser observados em

ancestrais imediatos, as regiões não conservadas das sequências são o resultado da acumulação de mutações, seja por inserção ou deleção de um ou vários nucleotídeos ou por substituição pontual de um nucleotídeo por outro. A fonte principal de mutações em vírus são percalços na replicação e a recombinação de RNA (2).

Apesar da utilidade da filogenética e dos softwares comerciais e públicos disponíveis para análises filogenéticas, os métodos filogenéticos são muitas vezes aplicados de forma inadequada. Mesmo quando aplicados adequadamente, são mal explicados e, portanto, mal compreendidos. (15, p. 1) Além disso, por trabalhar com grandes quantidades de dados, os métodos utilizados devem ser avaliados também em relação ao seu custo computacional.

As soluções até então desenvolvidas, são guiadas pela reconstrução das árvores filogenéticas construídas a partir das mutações de nucleotídeos. Neste aspecto, as ferramentas disponíveis não oferecem uma aplicação no contexto de árvores reconstruídas com distâncias obtidas a partir da diferença do uso de códons. Estes são sequências de três nucleotídeos responsáveis pela codificação dos aminoácidos nas proteínas. Os códons desempenham um papel crucial na determinação da função e estrutura das proteínas, e alterações nos códons podem resultar em mudanças significativas nas características fenotípicas dos vírus. Portanto, é necessário a realização de pesquisas e desenvolvimento de ferramentas que capazes de classificar sequências genéticas com base no uso de códons.

Com base no problema de pesquisa proposto, foram construídos os objetivos que deveriam ser atingidos, os mesmos são apresentados a seguir:

- **Objetivo Geral**

- (i) Desenvolver um novo método de análise da evolução molecular viral.

- **Objetivos Específicos**

- (i) Montagem de dataset do projeto
- (ii) Definir um modelo para validação do método proposto
- (iii) Desenvolver uma de ferramenta para caracterizar/validar o método
- (iv) Coletar os dados necessários para validar o método
- (v) Realizar a comparação da performance computacional do novo método com algum dos métodos do estado da arte.
- (vi) Disponibilizar o modelo como uma ferramenta web de fácil acesso.

Esta monografia seguirá uma estrutura cuidadosamente elaborada para abordar de forma abrangente o projeto de desenvolvimento da ferramenta de análise de genes virais baseada no uso de códons. A seguir, descrevemos cada seção, delineando seu conteúdo e importância na apresentação do trabalho:

- **Capítulo 1: Introdução**

O capítulo introdutório contextualiza o problema abordado, destacando sua relevância, importância e necessidade na área de análise de genes virais. Além disso, apresenta a estrutura da monografia, fornecendo uma visão geral das seções subsequentes.

- **Capítulo 2: Fundamentação Teórica**

Este capítulo estabelece as bases teóricas para o projeto. Explora conceitos essenciais relacionados a genes virais, códons, filogenética, metodologia DSR e outras áreas relevantes. É fundamental para a compreensão dos métodos e resultados apresentados posteriormente.

- **Capítulo 3: Descrição do Projeto**

Neste capítulo, detalhamos o projeto em sua totalidade. Isso inclui a metodologia utilizada, materiais e métodos empregados, bem como o plano de implementação. Abordaremos a montagem e preparação do dataset, desenvolvimento do modelo e a análise comparativa do modelo proposto e outro existente.

- **Capítulo 4: Montagem e Preparação do Dataset**

Este capítulo concentra-se nas etapas iniciais do projeto, destacando o processo de montagem do dataset. Descreveremos o procedimento de recuperação de sequências, filtragem, alinhamento, extração de genes de interesse e a remoção de sequências duplicadas. Essas etapas são fundamentais para obter um dataset de alta qualidade.

- **Capítulo 5: Desenvolvimento do Modelo**

Aqui, detalharemos a implementação do modelo de classificação não supervisionada com base em códons. Isso envolverá a tradução de sequências de DNA, a extração de códigos únicos e o processo de agrupamento. O capítulo também abordará a associação de clusters com classes de sequências.

- **Capítulo 6: Análise Comparativa do Modelo Proposto e Outro Existente**

Nesta seção, realizaremos uma análise comparativa entre o método desenvolvido neste projeto e as técnicas clássicas de filogenética. Avaliaremos o desempenho, precisão e eficiência do nosso modelo em relação aos métodos tradicionais.

- **Capítulo 7: Considerações Finais**

A última seção da monografia destacará as principais conclusões, contribuições do projeto e recomendações para pesquisas futuras. Também enfocará as implicações práticas da ferramenta desenvolvida e seu impacto na análise de genes virais.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A análise de genes virais baseada em codons é um campo interdisciplinar que exige uma sólida compreensão de diversos conceitos e técnicas. Neste capítulo, exploraremos a fundamentação teórica necessária para a compreensão completa do projeto. Começaremos por abordar os princípios fundamentais da genética viral, discutindo o que é um genoma viral e o papel dos genes em vírus. Em seguida, examinaremos detalhadamente o código de codificação genética, conhecido como código IUPAC, que é essencial para traduzir sequências de nucleotídeos em sequências de aminoácidos.

Este capítulo também destacará a importância da filogenética na classificação de genes virais e como as árvores filogenéticas são construídas com base em informações genéticas. Além disso, discutiremos a metodologia de Design Science Research (DSR), que serve como um guia metodológico para o desenvolvimento da nossa ferramenta.

Para entender completamente os métodos e resultados apresentados nos capítulos subsequentes, é crucial absorver os conceitos apresentados aqui. O conhecimento teórico sólido proporcionará a base necessária para a análise crítica do desenvolvimento da nossa ferramenta de análise de genes virais baseada em codons.

Vamos começar esta jornada pela fundamentação teórica que sustenta o projeto, garantindo uma compreensão sólida e fundamentada de cada passo subsequente.

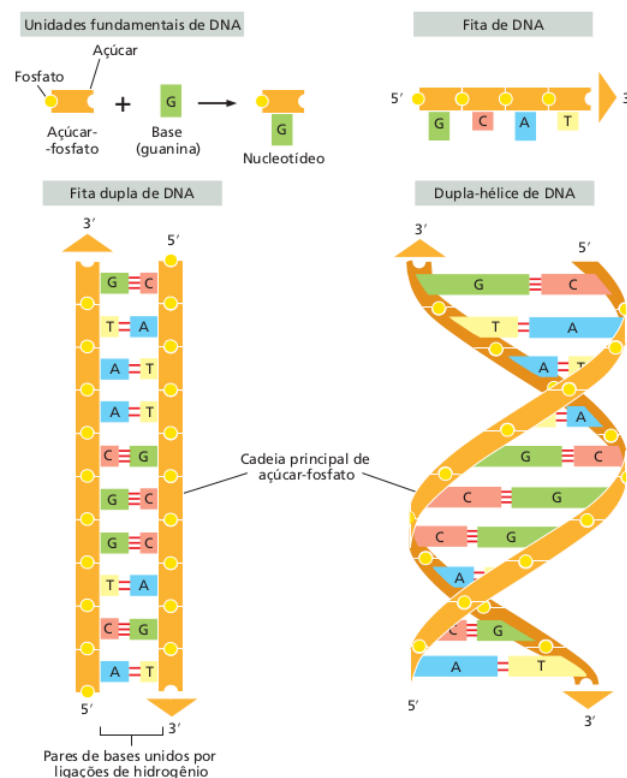
2.1 BIOLOGIA MOLECULAR

A Biologia Molecular é um ramo da biologia que lida e investiga os processos e mecanismos moleculares relacionados à estrutura, função e interações das biomoléculas presentes nos organismos vivos. Consiste principalmente em estudar as interações entre os vários sistemas da célula, partindo da relação entre o DNA, RNA e a síntese de proteínas, e o modo como essas interações são reguladas.

É fundamental entender a estrutura do DNA apresentada na Figura 1. Está é uma

molécula em forma de dupla hélice que carrega a informação genética em organismos vivos. Ela é composta por duas cadeias polinucleotídicas complementares enroladas em torno de um eixo central. Cada cadeia é composta por uma sequência de nucleotídeos, que consistem em uma pentose (a desoxirribose), um grupo fosfato e uma base nitrogenada que pode ser adenina (A), timina (T), citosina (C) ou guanina (G). A estrutura do DNA é mantida por pontes de hidrogênio entre as bases complementares, com a adenina pareando sempre com a timina e a citosina pareando sempre com a guanina.

Figura 1 – Estrutura do DNA.



Fonte: Retirada de Alberts et al.(20)

Além das bases nitrogenadas originais já apresentadas (A, T, C e G), a União Internacional de Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) (IUPAC) que é uma organização não governamental internacional dedicada ao avanço da química, desenvolveu também outras codificações, conhecida como *IUPAC Nucleotide Code*, para representar de maneira padronizada as bases nitrogenadas encontradas nas moléculas de ácido nucleico. Também são apresentadas outras letras que representam pares de bases ou misturas específicas, a letra “N” que é usada para representar uma base desconhecida ou não especificada e os símbolos de “.” ou “-”, conhecidos como “GAP”, ou seja, representa onde há uma base identificável ou onde a informação é faltante. As mesmas são apresentadas na tabela 1 a seguir.

Tabela 1 – *IUPAC Nucleotide Code*.

Base	IUPAC Nucleotide Code
Adenina	A
Citosina	C
Guanina	G
Timina	T
Uracila	U
A ou G	R
C ou T	Y
A ou C	M
G ou T	K
G ou C	S
A ou T ou G	W
C ou G ou T	B
A ou C ou T	D
A ou G ou T	H
C ou G ou A	V
A ou C ou G ou T	N
GAP	. ou -

Fonte: Criada pelo autor.

O conjunto completo de material genético contido em um organismo, seja ele um vírus, uma bactéria, uma planta ou um animal é conhecido como genoma. Ele abrange todas as informações genéticas necessárias para o desenvolvimento, funcionamento e reprodução do organismo. O genoma é composto por sequências de DNA que carregam as instruções para a síntese de proteínas e regulam várias funções celulares. A análise do genoma desempenha um papel fundamental na genética, na biologia molecular e na compreensão da hereditariedade e da evolução. (20)

As informações contidas no DNA são copiadas em uma molécula de RNA, esse processo é conhecido como transcrição. A transcrição ocorre no núcleo das células e envolve a separação das duas fitas do DNA e o pareamento de nucleotídeos complementares para sintetizar uma molécula de Ácido Ribonucleico Mensageiro (*Messenger Ribonucleic Acid*) (mRNA). O mRNA é uma cópia do DNA que carrega a sequência de bases nitrogenadas correspondente a um gene específico. Após isso, ocorre o processo de tradução onde a sequência de bases nitrogenadas do mRNA é utilizada para sintetizar proteínas. A tradução ocorre nos ribossomos, presentes no citoplasma celular. Durante a tradução, o mRNA é lido em grupos de três bases, chamados de códons. Os códons são sequências de três nucleotídeos consecutivos no RNA que correspondem a um aminoácido específico. Existem 64 códons possíveis, correspondentes a

20 aminoácidos diferentes como apresentado na Figura 2, além de sinais de início e parada da tradução. A tradução é o processo pelo qual a sequência de códons no RNA é utilizada para sintetizar proteínas. Durante a tradução, os códons são reconhecidos por moléculas de RNA transportador (tRNA) que trazem os aminoácidos correspondentes.

Figura 2 – Tabela de Códons.

		Segunda letra					
		U	C	A	G		
Primeira letra	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA Parada UAG Parada	UGU } Cys UGC } UGA Parada UGG Trp	U C A G	Terceira letra
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	U C A G	
	A	AUU } AUC } Ile AUA } AUG Met	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	U C A G	
	G	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	U C A G	

Fonte: Adaptade de OpenStax(21)

A relação entre os códons, o DNA e o RNA é crucial para a síntese de proteínas e a expressão genética. O sequenciamento do DNA e a identificação dos códons correspondentes permitem a inferência das sequências de aminoácidos nas proteínas codificadas por um determinado gene. Cada códon especifica um aminoácido distinto. Os aminoácidos são transportados para o ribossomo por moléculas de Ácido Ribonucleico Transportador (*Transporter Ribonucleic Acid*) (tRNA), que possuem um anticódon complementar ao códon do mRNA. À medida que o ribossomo percorre o mRNA, os aminoácidos são ligados em uma sequência específica, formando uma cadeia polipeptídica que será dobrada e modificada para se tornar uma proteína funcional (20).

Para determinar a ordem exata dos nucleotídeos em uma molécula de DNA ou RNA é realizada uma técnica conhecida como sequenciamento genético. Existem várias técnicas de sequenciamento, cada uma com suas vantagens e desvantagens, sendo as mais notáveis o sequenciamento de Sanger, o Sequenciamento de Nova Geração (*Next-generation Sequence*) (NGS) e o sequenciamento de terceira geração. (22, 23, 24)

2.2 VÍRUS

Os vírus são agentes infecciosos que possuem uma estrutura viral que varia entre os seus diferentes tipos, mas que de modo geral é composta por uma cápsula proteica chamada capsídeo, que envolve o material genético viral, que pode ser DNA ou RNA. O capsídeo pode apresentar diferentes formas, como hélices, icosaedros ou formas complexas. Além do capsídeo, alguns vírus possuem uma camada lipídica chamada envelope viral, que é derivada da membrana da célula hospedeira e contém glicoproteínas virais que são importantes para a entrada do vírus nas células hospedeiras (25). O ciclo e vida viral é conjunto de etapas que um vírus passa para se reproduzir e infectar novas células. Esse ciclo pode variar entre diferentes tipos de vírus, mas geralmente envolve as seguintes etapas (13):

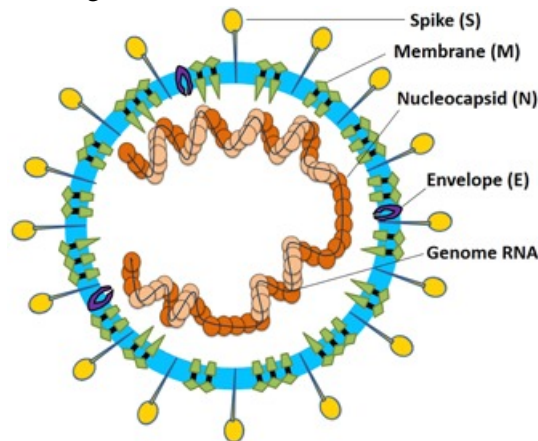
1. **Adsorção:** o vírus se liga especificamente a receptores na superfície da célula hospedeira.
2. **Penetração:** o vírus é internalizado na célula hospedeira, liberando seu material genético.
3. **Replicação e síntese de proteínas virais:** o material genético viral é transportado para os ribossomos da célula hospedeira, replicado e transcrito em moléculas de mRNA, que são utilizadas para a síntese de proteínas virais.
4. **Montagem:** as proteínas virais se unem para formar novas partículas virais.
5. **Liberação:** as novas partículas virais são liberadas da célula hospedeira, para a montagem de novos vírus e para a modificação do ambiente celular para garantir a sua replicação.

2.2.1 SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2 é um vírus da família Coronaviridae, que causa a doença chamada COVID-19. Ele foi identificado pela primeira vez em dezembro de 2019 na cidade de Wuhan, na província de Hubei, na China, e desde então se espalhou para todo o mundo, resultando em uma pandemia global (26, 27).

O SARS-CoV-2 possui uma estrutura viral apresentada na Figura 3, característica dos coronavírus. Ele é composto por uma partícula viral esférica, com um envelope lipídico que envolve seu material genético. A estrutura do vírus inclui proteínas de espículas na sua superfície, conhecidas como proteína spike (S). Além disso, o SARS-CoV-2 possui proteínas de membrana (M), envelope (E) e nucleocapsídeo (N), que desempenham papéis importantes na estrutura e na replicação viral.

Figura 3 – Estrutura do coronavírus.



Fonte: Retirada de Li et al.(28)

A proteína Spike (S) do vírus SARS-CoV-2 é uma das principais proteínas de superfície do vírus e desempenha um papel crucial na infecção das células hospedeiras. Ela é uma glicoproteína que forma estruturas semelhantes a espículas na superfície do vírus, dando-lhe uma aparência coroadada. A proteína Spike é o alvo principal das respostas imunes do hospedeiro e é fundamental para a ligação do vírus às células humanas e sua subsequente entrada.

A proteína Spike é composta por três domínios principais: o domínio de ligação ao receptor (RBD - Receptor-Binding Domain), o domínio de fusão (FD - Fusion Domain) e o domínio N-terminal (NTD - N-Terminal Domain). O RBD é particularmente importante, pois é responsável pela interação com o receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) nas células hospedeiras humanas. Essa interação é crucial para a entrada do vírus nas células.

A estrutura da proteína Spike é altamente dinâmica e pode mudar de conformação para facilitar a fusão da membrana viral com a membrana da célula hospedeira, permitindo assim a entrada do vírus. Essa capacidade de mudança conformacional torna a proteína Spike um alvo promissor para o desenvolvimento de vacinas e terapias antivirais.

Estudos detalhados da proteína Spike são essenciais para compreender a patogenicidade do vírus SARS-CoV-2 e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes. Além disso, mutações na proteína Spike têm sido identificadas como uma das principais causas de variantes do vírus, o que destaca ainda mais a importância de sua investigação contínua.

2.3 BIOINFORMÁTICA

2.4 FILOGENIA

A filogenia é uma disciplina da biologia que estuda as relações evolutivas entre organismos, buscando reconstruir a história evolutiva e a ancestralidade comum. A filogenética molecular é uma abordagem utilizada para inferir a filogenia com base em informações moleculares, como sequências de DNA, RNA e proteínas(29).

A construção de árvores filogenéticas é um aspecto fundamental da filogenética molecular. Existem vários métodos utilizados para construir árvores filogenéticas, que podem ser classificados em dois grupos principais: métodos baseados em distância e métodos baseados em caracteres. Os métodos baseados em distância medem a similaridade ou a dissimilaridade entre sequências moleculares e constroem árvores filogenéticas com base nessas medidas. Alguns exemplos de métodos baseados em distância incluem o método de Neighbor Joining (NJ) e o método de Mínima Evolução (ME). Por outro lado, os métodos baseados em caracteres analisam as mudanças nos caracteres moleculares ao longo do tempo para inferir as relações filogenéticas. Exemplos de métodos baseados em caracteres são o método de Máxima Parcimônia (MP) e o método de Inferência Bayesiana(30).

Ao longo dos anos, vários métodos utilizados para análise filogenética foram desenvolvidos, logo após, será apresentado alguns dos principais e amplamente utilizados:

1. **Método de reconstrução de árvore filogenética de distância (1957):** Esse método é baseado na construção de árvores filogenéticas a partir de uma matriz de distâncias que quantifica a diferença evolutiva entre diferentes sequências. A árvore é construída de modo que as sequências mais semelhantes estejam mais próximas umas das outras. Esse método é amplamente utilizado em análises filogenéticas e é uma das técnicas mais antigas (31).
2. **Método de máxima parsimônia (1966):** A máxima parsimônia busca a árvore filogenética mais simples, ou seja, aquela que requer o menor número de mudanças evolutivas para explicar as sequências observadas. Esse método é baseado no princípio de que a evolução segue o caminho mais econômico, evitando mudanças desnecessárias (32).
3. **Método de máxima verossimilhança (1981):** O método de máxima verossimilhança estima a árvore filogenética que maximiza a probabilidade de observar as sequências dadas, dadas as hipóteses filogenéticas. Ele é baseado na modelagem estatística da evolução

molecular e é amplamente considerado um dos métodos mais precisos para a reconstrução de árvores filogenéticas (33).

4. **Método de junção de vizinhos (1987):** O método Neighbor-Joining é uma técnica de construção de árvore filogenética que se baseia em uma abordagem de aglomeração hierárquica. Ele é amplamente utilizado para criar árvores filogenéticas a partir de matrizes de distância, representando a proximidade evolutiva entre sequências ou espécies. Esse método é especialmente útil para análises de grandes conjuntos de dados e é conhecido por sua eficiência computacional (34).
5. **Método de inferência bayesiana (2001):** A inferência bayesiana combina informações a priori com dados observados para estimar a árvore filogenética mais provável. Ela se baseia no Teorema de Bayes e permite incorporar informações prévias sobre as relações filogenéticas. Esse método é particularmente útil quando se dispõe de conhecimento prévio sobre as relações entre as espécies (35).
6. **Método de coalescência (2004):** O método de coalescência, também conhecido como filogenia de coalescência, aborda a filogenia a partir do ponto de vista do ancestral comum mais recente. Ele modela a história da população ancestral e como as sequências evoluíram a partir dessa população. Esse método é especialmente útil para analisar sequências de genes individuais (36).
7. **Método de redes filogenéticas (2005):** As redes filogenéticas são uma extensão das árvores filogenéticas que permitem representar relacionamentos mais complexos, como reticulações ou eventos de hibridização. Elas são úteis quando as relações entre as espécies não podem ser adequadamente representadas por uma árvore simples (37).
8. **Método de filogenia de genoma inteiro (2010):** Esse método se concentra na análise comparativa de genomas completos para inferir relações filogenéticas. Ele utiliza informações genômicas de alta resolução, como sequências de genes e elementos regulatórios, para construir árvores filogenéticas que refletem a evolução das espécies (38).

2.4.1 Nomenclaturas de Linhagens do SARS-CoV-2

A nomenclatura das linhagens do SARS-CoV-2 é uma parte crucial na classificação e rastreamento das diferentes variantes do vírus. Duas das principais nomenclaturas usadas para descrever essas linhagens são a nomenclatura PANGO e a nomenclatura da WHO. Essas nomenclaturas são usadas para descrever as diferentes variantes do vírus com base em suas

características genéticas e filogenéticas.

A nomenclatura PANGO é uma abordagem baseada na filogenia para nomear e rastrear as linhagens do SARS-CoV-2. Ela atribui um nome único a cada linhagem com base em sua posição na árvore filogenética do vírus. Isso permite uma identificação clara das diferentes linhagens e ajuda na compreensão de como o vírus está evoluindo ao longo do tempo. (39) Já a WHO também desenvolveu sua própria nomenclatura para classificar as variantes do SARS-CoV-2. Essa nomenclatura envolve letras gregas, como Alpha, Beta, Gamma, Delta, e assim por diante. Cada variante é nomeada com base nas letras gregas em ordem alfabética e é usada para evitar estigmatização de locais geográficos ou populações. (40)

A tabela 2 apresentada a seguir, contem as principais variantes com as suas respectivas nomenclaturas PANGO e WHO

Tabela 2 – *Nomenclaturas PANGO e WHO.*

Nomenclatura PANGO	Nomenclatura WHO
B.1.1.7	Alpha
B.1.1.529	Omicron
B.1.351	Beta
B.1.617.2	Delta
P.1	Gamma

Fonte: Criada pelo autor.

2.5 MACHINE LEARNING

Machine learning é uma subárea da inteligência artificial que se concentra no desenvolvimento de algoritmos e modelos que permitem a um sistema aprender a partir de dados e realizar tarefas específicas sem ser explicitamente programado. Dentro do campo do machine learning, existem duas categorias principais de aprendizado: supervisionado e não supervisionado. Neste contexto, abordaremos a segunda categoria, com ênfase nos modelos não supervisionados.

O aprendizado não supervisionado é uma abordagem de machine learning na qual o algoritmo é treinado em dados não rotulados, ou seja, dados que não têm rótulos ou categorias previamente atribuídos. O objetivo do aprendizado não supervisionado é explorar a estrutura e os padrões subjacentes aos dados sem orientação externa. Isso torna o aprendizado não supervisionado útil para tarefas em que a natureza dos dados é desconhecida, e os padrões

emergentes devem ser identificados.

Um dos principais tipos de tarefa no aprendizado não supervisionado é o agrupamento (clustering). Nessa tarefa, o algoritmo identifica grupos ou clusters de dados que compartilham características semelhantes. O objetivo é agrupar dados de acordo com suas propriedades intrínsecas, sem conhecimento prévio das categorias. Algoritmos de clustering, como o K-Means e o Hierarchical Clustering, são amplamente utilizados em campos como biologia, processamento de imagem, análise de dados e muito mais.

O aprendizado não supervisionado é fundamental em diversas aplicações. Na biologia, por exemplo, algoritmos de clustering podem ser usados para identificar grupos de genes que são coexpressos, revelando padrões de regulação genética. Em finanças, a redução de dimensionalidade pode ser aplicada para entender a relação entre diferentes ativos financeiros. Na área de processamento de linguagem natural, o aprendizado não supervisionado é usado para detectar tópicos em grandes volumes de texto.

Apesar de sua versatilidade, o aprendizado não supervisionado também apresenta desafios. A interpretação dos resultados pode ser complexa, pois não há rótulos de classe para validar as descobertas. Além disso, a escolha de hiperparâmetros e a avaliação da qualidade do agrupamento ou da redução de dimensionalidade podem ser complicadas.

Em resumo, o aprendizado não supervisionado desempenha um papel fundamental no campo do machine learning, permitindo a extração de informações valiosas de dados não rotulados. Sua capacidade de encontrar estrutura oculta nos dados é crucial em uma variedade de domínios, tornando-o uma ferramenta poderosa na análise e interpretação de informações complexas.

2.6 TRABALHOS CORRELATOS

Na busca de trabalhos relacionados, vários métodos foram encontrados, e a seguir são apresentados.

O método de Máxima Verossimilhança (ML) (ou *Maximum Likelihood*), não é exclusivo da filogenia, mas sim uma abordagem estatística. A sua aplicação em filogenia consiste em avaliar a probabilidade de que o modelo de evolução escolhido gere os dados observados, que são por exemplo, características de um organismo. Essa proposta foi utilizada nos seguintes

trabalhos:

- Behl et al.(2)
- Fall et al.(41)
- Shabbir et al.(42)
- Hudu et al.(43)
- Sallard et al.(44)
- Paez-Espino et al.(45)
- Tang et al.(46)
- Cho et al.(47)

Já em *Yin et al.* e *Bedoya-Pilozo et al.*, foi usada a inferência bayesiana, que é fundamentada no teorema de Bayes, que permite a atualização das probabilidades a priori para probabilidades a posteriori à medida que novas evidências são incorporadas.

Além desses, Potdar et al.(50) utilizou a junção de vizinhos (ou *Neighbor-Joining*), que é baseado em uma abordagem heurística que visa construir uma árvore filogenética a partir de uma matriz de distância entre as sequências estudadas. O trabalho de Lichtblau(51) expõe o Frequency Chaos Game Representation e Kim et al.(52) a floresta aleatória. Por fim, Dimitrov et al.(53) comparou três modelos para reconstrução de árvores filogenéticas: junção de vizinhos; ML e inferência bayesiana.

3 DESCRIÇÃO DO PROJETO

A seguir, serão apresentadas a metodologia e os softwares utilizados neste estudo, bem como as etapas detalhadas de sua implementação.

3.1 METODOLOGIA

Um ponto importante para a obtenção dos objetivos deste trabalho está relacionada a definição da metodologia que servirá como alicerce. Com a proposta de desenvolver e validar um método de análise da evolução molecular de vírus com base no uso de códons, a metodologia escolhida para isso é o DSR. Essa metodologia, proporciona um framework teórico e prático para a criação de artefatos inovadores, como métodos, modelos ou frameworks, visando resolver problemas específicos (54). Neste projeto, a ferramenta de análise de genes virais baseada em códons é o artefato que será desenvolvido e avaliado. Além disso, o DSR enfatiza a validação e a avaliação da utilidade e eficácia do artefato em relação aos seus objetivos práticos. No caso deste projeto, a validação será realizada através da comparação dos resultados obtidos com a ferramenta proposta em relação às técnicas clássicas filogenéticas, que são amplamente utilizadas para a análise de genes virais. Essa comparação permitirá avaliar a eficácia e o valor agregado da abordagem baseada em códons.

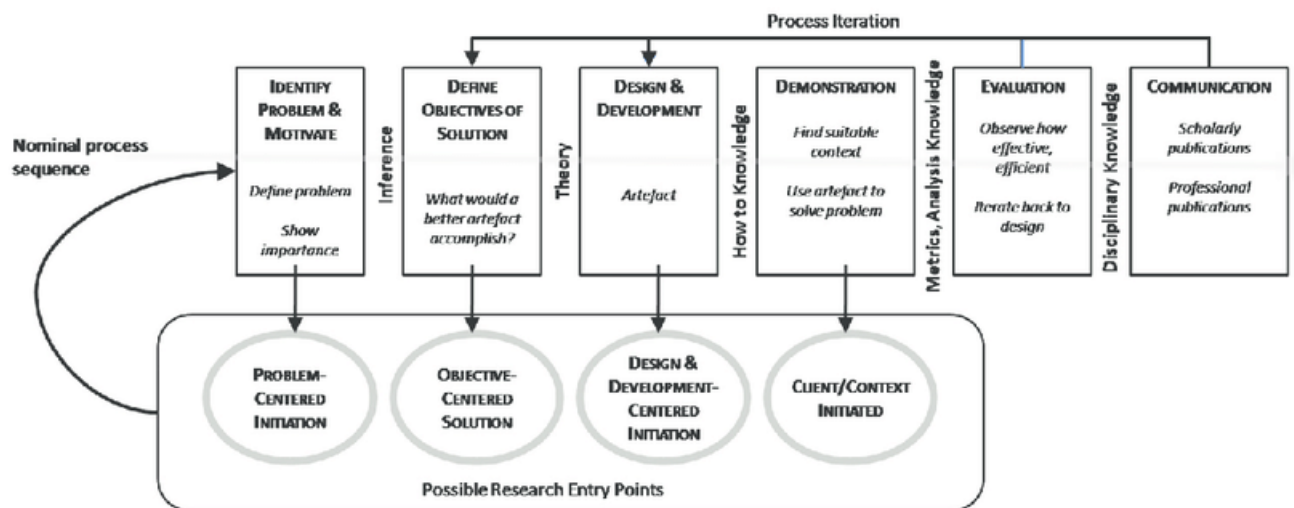
Para a obtenção de sucesso ao utilizar o DSR os seguintes passos serão seguidos:

1. **Identificação do problema e definição dos objetivos:** Nesta fase, o problema a ser resolvido é identificado e compreendido em detalhes. No contexto deste projeto, isso envolveria a compreensão das limitações das abordagens existentes para a classificação de genes virais.
2. **Concepção e planejamento:** Aqui, são definidos os objetivos do artefato a ser criado, suas características e funcionalidades. No projeto em questão, isso envolveria a definição da funcionalidade da ferramenta de análise de genes virais com base em códons.
3. **Desenvolvimento dos artefatos:** Nesta fase, o artefato é desenvolvido. Para o projeto, isso incluiria a criação dos scripts de download, processamento, tradução de sequências, algoritmos de agrupamento e outras partes da ferramenta.

4. **Avaliação do artefato:** O artefato é testado e avaliado quanto à sua eficácia na resolução do problema. Isso pode incluir testes de desempenho, experimentos e comparações com métodos existentes.
5. **Apresentar contribuições científicas:** Os resultados e contribuições do artefato são comunicados, geralmente por meio de artigos científicos e relatórios técnicos.
6. **Iteração:** O processo é iterado conforme necessário. À medida que novos problemas ou insights surgem, o artefato é aprimorado.

Sendo assim, como apresentado na figura4, os passos citados anteriormente são realizados em uma iteração constante, até a obtenção do objetivo final.

Figura 4 – Processo iterativo da metodologia DSR.



Fonte: O Autor

Também será utilizada análises quantitativas, ou seja, medidas estatísticas para mensurar e comparar os resultados obtidos.

A pesquisa quantitativa só tem sentido quando há um problema muito bem definido e há informação e teoria a respeito do objeto de conhecimento, entendido aqui como o foco da pesquisa e/ou aquilo que se quer estudar. Esclarecendo mais, só se faz pesquisa de natureza quantitativa quando se conhece as qualidades e se tem controle do que se vai pesquisar (55).

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta sessão, será apresentada as ferramentas utilizadas para a construção e desenvolvimento de todo o trabalho.

O Python é uma linguagem de programação de alto nível, interpretada, iterativa e de código aberto. Foi criada por Guido van Rossum e lançada em 1991. A linguagem é conhecida por ter uma sintaxe simples, tornando-a popular para o desenvolvimento de software, automação, análise de dados, aprendizado de máquina entre outras aplicações. A mesma apresenta suporte a vários paradigmas de programação, como a orientada a objetos, imperativa, procedural e funcional. Além disso, o Python é portátil, podendo ser executado em diversos sistemas operacionais como Linux, Mac e Windows (56).

Para a construção dos pipelines do projeto, utilizamos Python em conjunto com o Jupyter Notebook. O Jupyter Notebook é uma aplicação de código aberto que permite criar documentos interativos que integram código, texto narrativo e visualizações. É uma ferramenta amplamente adotada por cientistas de dados, pesquisadores e desenvolvedores para explorar dados, prototipar código, documentar projetos e facilitar a colaboração. Além disso, o Jupyter Notebook oferece suporte a diversas linguagens de programação, incluindo Python (57).

O python possui uma gama de bibliotecas que facilitam a implementação de soluções complexas. A seguir serão apresentadas as bibliotecas utilizadas:

- **Biopython:** Coleção de bibliotecas e ferramentas em Python, disponíveis gratuitamente para biologia molecular computacional. Ele fornece uma ampla gama de funcionalidades, desde a leitura e análise de arquivos de sequência biológica até a execução de algoritmos sofisticados de bioinformática. Desenvolvida e mantida pelo Projeto Biopython, que é uma associação internacional de desenvolvedores de ferramentas python (58).
- **Selenium:** Biblioteca de código aberto que fornece uma interface programática para automatizar interações com navegadores da web. É amplamente utilizado por desenvolvedores e testadores de software para realizar testes automatizados, raspagem de dados na web e outras tarefas que envolvem interações com páginas da web. O Selenium para Python permite a automação de ações como clicar em botões, preencher formulários, navegar em sites e extrair informações da web, tornando-o uma ferramenta valiosa para desenvolvimento e automação de tarefas na web (59).

3.3 PLANO DE IMPLEMENTAÇÃO

Durante o desenvolvimento do projeto foi necessário dividir o projeto em fases com base nas atividades que deveriam ser realizadas de forma a atender todos os passos descritos

na seção 3.1. As principais fases identificadas foram: Montagem e preparação do dataset a ser utilizado pelo modelo; Desenvolvimento completo do modelo, com todos as definições, implementações, testes e correções necessárias; e a análise comparativa que será realizada com um outro método existente e já tradicional. Esses pontos são apresentados de forma minuciosa a seguir.

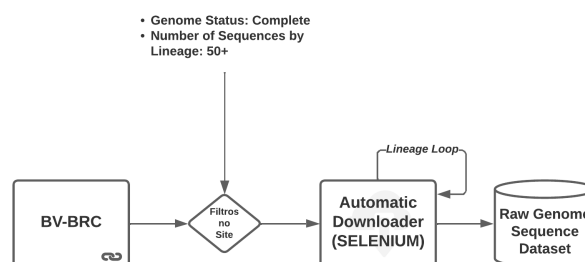
3.3.1 Montagem e Preparação do Dataset

Para realizar o treinamento do modelo a ser construído, eram necessárias sequências únicas e alinhadas do gene Spike. Em vista disso, é importante salientar que o site Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (BV-BRC) disponibiliza sequências genômicas, e sendo assim, foi preciso construir um pipeline para, após o download das sequências, transformar as mesmas para a criação de um dataset com as sequências que atendessem os requisitos esperados.

Inicialmente, foi realizada uma análise do BV-BRC, para entender a sua estrutura e verificar também se era possível realizar o download de todas as sequências queridas de forma manual. Foi verificado que o site possuía uma área de seleção de filtros, e foi definido que só seriam selecionadas sequências completas no campo *Genome Status* e no campo *Lineage*, onde é possível filtrar as sequências pelo seu tipo *Pango* e também verificar a quantidade, só os que tivessem mais de 50 sequências do mesmo tipo.

Após a análise, foi constatado que realizar o download manualmente era infactível, e que seria preciso automatizar esse processo de iteração com a página, como vistos na Figura 5. Isto posto, foi realizada uma sequência de passos conhecidos como *Web Scrapping* utilizando o Python juntamente com o Selenium, apresentados em seguida:

Figura 5 – Pipeline de Download das Sequências Genômicas.



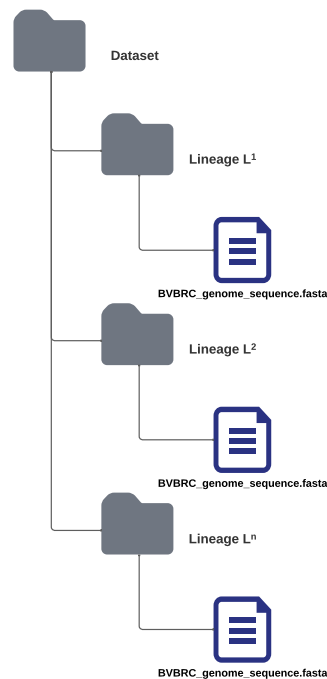
Fonte: O Autor

1. Criar uma lista com todas as linhagens disponíveis e a quantidade de sequências de cada.

2. Desenvolver script Python para remover as linhagens com menos de 50 sequências da lista.
3. Desenvolver script Python para gerar uma url personalizada do BV-BRC, já com os filtros, para cada linhagem.
4. Desenvolver script Python juntamente com o Selenium para abrir as urls de forma automática e realizar o download das sequências.

Ao final do processo de montagem do dataset, realizado no dia 02 junho de 2023, com sequências genômicas completas, foi gerado um diretório raiz (dataset), e dentro deste, um diretório para cada linhagem ($Lineage L^1$, $Lineage L^2$, \dots , $Lineage L^n$), contendo um arquivo nomeado BVBRC_genome_sequence.fasta, como apresentado na figura 6.

Figura 6 – Dataset de sequências genômicas.



Fonte: O Autor

Ao finalizar o processo de download, o *dataset* completo ficou com as seguintes informações apresentadas na tabela 3.

A seguir, era necessário construir um dataset de sequências do gene Spike a partir do existente. Para isso, com o objetivo de diminuir o tempo de execução dos pipelines durante o desenvolvimento, foi construído também, um dataset de testes, apresentado na tabela 4, que serviria como base para execução das atividades, e após as verificações, seria realizado o processo com o dataset completo. No dataset de testes, foram escolhidas 5 (cinco) linhagens que são

Tabela 3 – Informações do dataset de sequências genômicas.

Campo	Valor
Quantidade de Linhagens	1086
Quantidade de Sequências Genômicas	1.494.650
Tamanho em Gigabyte (GB)	47.5

Fonte: Criada pelo autor.

amplamente conhecidas (gamma, delta, alpha, beta e omicron), o que tornaria mais preciso o processo de validação futuramente.

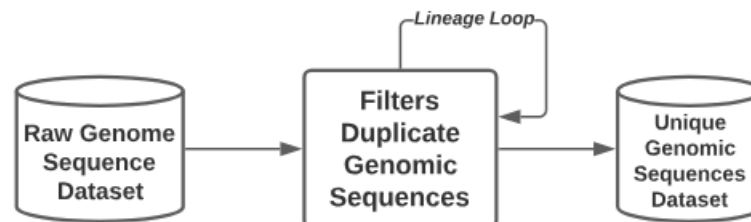
Tabela 4 – Informações do dataset de teste de sequências genômicas.

Pango	WHO	Quantidade de Sequências	Tamanho em Megabyte (MB)
B.1.1.7	Alpha	9982	307
B.1.1.529	Omicron	3694	112.7
B.1.351	Beta	5256	160.6
B.1.617.2	Delta	9996	305.3
P.1	Gamma	10000	305.9
Total		38928	1191,5

Fonte: Criada pelo autor.

Depois, foi verificado a existência de sequências genômicas idênticas, melhor dizendo, sequências com exatamente a mesma quantidade e ordem dos nucleotídeos. Por isso, foi necessário desenvolver um pipeline que filtrasse as sequências repetidas, e mantivesse apenas uma, como exibido na figura 7, gerando assim um novo dataset de sequências genômicas únicas.

Figura 7 – Pipeline de Filtragem de Sequências Genômicas Duplicadas.

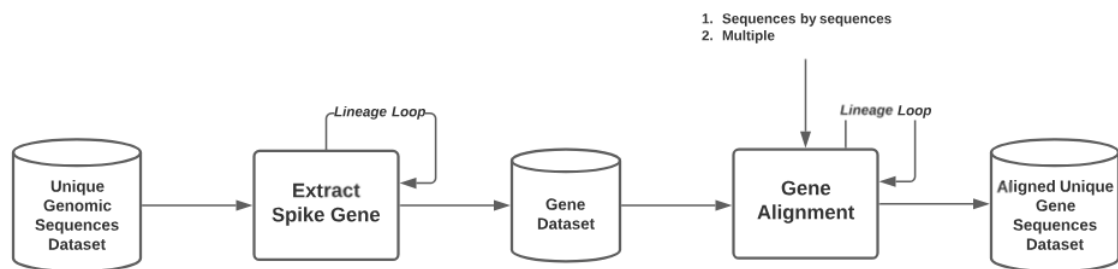


Fonte: O Autor

Com o dataset de sequências únicas montado, foi decidido os passos a seguir, que seriam executados com o papel de atingir o objetivo de obter o dataset de sequências gênicas únicas e alinhadas. Primeiro, como visto na figura 8, foi realizado o processo de extração do gene Spike, utilizando uma sequência de referência do gene obtida do dataset da *National Center*

for Biotechnology Information (NCBI)¹, juntamente com o software Blast, para encontrar e extrair o gene Spike de cada uma das sequências genômicas de todo o dataset. Após isso, com o dataset de sequências genicas já montado, era necessário realizar o processo de alinhamento das sequências. Foram verificada duas formas de realizar esse procedimento utilizando o software Clustalo Omega, uma passando uma sequência por vez (*sequence by sequence*) com a sequência do Spike de referência e outra passando todas as sequências com a referência (*multiple sequence*). Mesmo com o dataset de teste, que possuía um tamanho e quantidade de sequências muito inferior ao principal, o processo de alinhamento apresentou uma demora excessiva (até 2 dias) para finalizar. Em decorrência disso, o processo foi descontinuado, e um novo foi repensado e reconstruído e será apresentado a seguir.

Figura 8 – Pipelines descontinuado.



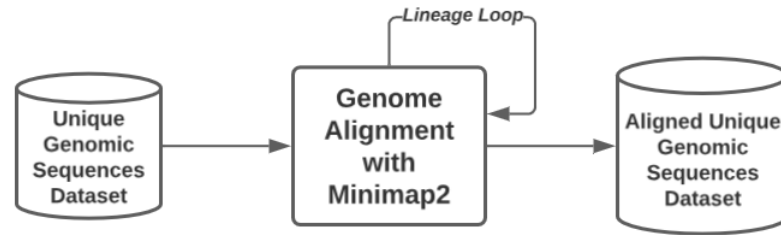
Fonte: O Autor

Após a análise com os orientadores, o processo, que continuou a partir das sequências genômicas únicas, foi feito seguindo os quatro (4) passos apresentados a seguir:

1. **Alinhamento das sequências genômicas:** A primeira etapa, como apresentado na figura 9, consistiu em alinhar as sequências genômicas únicas já disponíveis, utilizando a ferramenta de alinhamento Minimap2. O Minimap2 é uma ferramenta eficiente para mapear sequências genômicas em um genoma de referência. Esse processo permitiu a identificação de regiões específicas relacionadas ao gene spike nas sequências genômicas.
2. **Extração do Gene Spike com Uso de Isca:** Após o alinhamento, as sequências de referência do gene spike foram usadas como “iscas” para identificar e extrair as sequências correspondentes nas sequências genômicas alinhadas, como visto na figura 10. O gene spike é de importância crítica, pois desempenha um papel fundamental na interação do vírus com as células hospedeiras. A utilização de iscas garantiu que as sequências genicas

¹ Url para download: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_045512.2?report=genbank&from=21563&to=25384

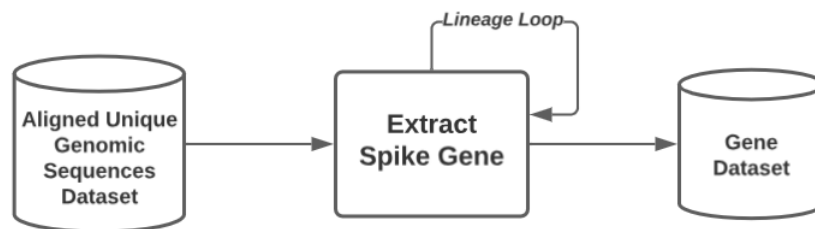
Figura 9 – Pipeline de Alinhamento de Sequências Genômicas Duplicadas.



Fonte: O Autor

fossem extraídas corretamente do genoma completo.

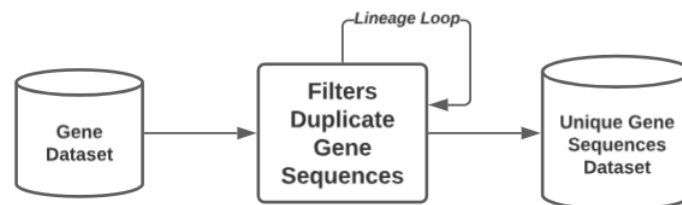
Figura 10 – Pipeline de Extração do Gene Spike das Sequências Genômicas Alinhadas.



Fonte: O Autor

3. **Filtragem de Sequências Genicas Duplicadas:** Uma das preocupações na criação do dataset foi a presença de sequências duplicadas, que podem enviesar os resultados da análise. Portanto, as sequências genômicas duplicadas foram identificadas e removidas do conjunto de dados. Esse processo garantiu que cada sequência fosse única, evitando redundâncias.

Figura 11 – Pipeline de Filtragem de Sequências Genicas Duplicadas.

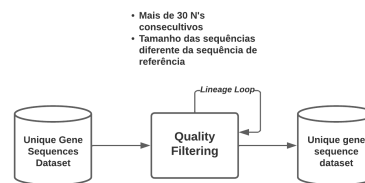


Fonte: O Autor

4. **Filtragem de Sequências de Má Qualidade:** Para garantir a qualidade do dataset, as sequências genômicas que continham características indesejáveis foram filtradas. Isso

incluiu a remoção de sequências que continham mais de 30 bases nitrogenadas (N) consecutivas e aquelas que não correspondiam ao tamanho esperado das sequências de referência do gene spike como visto na imagem 12. Essa filtragem ajudou a garantir que as sequências incluídas no dataset fossem de alta qualidade e relevantes para a análise subsequente.

Figura 12 – Pipeline de Filtragem de Sequências Genicas de Má Qualidade.

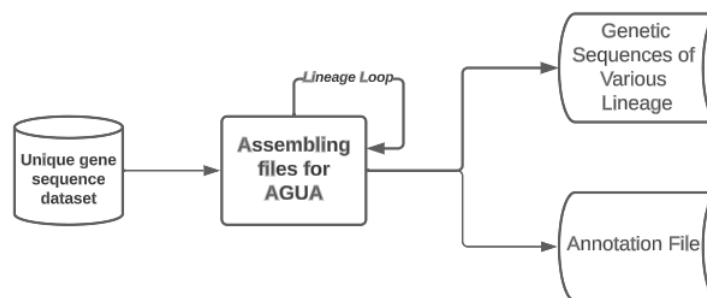


Fonte: O Autor

Ao final do processo, foi gerado um *dataset* de alta qualidade, contendo sequências gênicas únicas para as variantes alpha, beta, delta, gamma e omicron. Esse dataset será a base para a análise de genes virais com base no uso de códons e a aplicação de técnicas de classificação não supervisionada.

A partir deste dataset, foi elaborado 2 (dois) arquivos, conforme a figura 13 apresenta, que serviria de entrada, tanto para o modelo desenvolvido como para a geração de árvores filogenéticas utilizando o modelo convencional, a fim de se realizar análises futuras. Um arquivo compreendia a mescla de sequências genicas de cada uma das linhagem, e um arquivo de anotações que serviria como base no treinamento, contendo o cabeçalho da sequência, na mesma ordem em que estava no arquivo mesclado, juntamente com a linhagem da sequência.

Figura 13 – Arquivos de Entrada do AGUA.



Fonte: O Autor

3.3.2 AGUA

O modelo proposto foi nomeado como *Ad hoc Genotyping with Unsupervised* (AGUA). A seguir o mesmo será apresentado, desde a sua concepção, implementação e testes.

- Levantamento dos requisitos.
- Definir a arquitetura e a abordagem do modelo de classificação baseado em códons.
- Implementar o modelo utilizando uma biblioteca ou framework adequado.
- Desenvolver algoritmo para traduzir as sequências de DNA em sequências de códons.
- Realizar treinamento do modelo utilizando os dados preparados.
- Avaliar o desempenho do modelo utilizando métricas apropriadas.
- Identificar possíveis problemas e realizar ajustes no modelo.

3.3.3 Análise comparativa entre o método proposto (AGUA) e outro método existente

Nesta seção, apresentamos uma análise comparativa detalhada entre o método proposto e um método tradicional amplamente utilizado. O objetivo é avaliar o desempenho e a eficácia do nosso método em relação a uma abordagem estabelecida. Para esse fim, realizamos a análise em um conjunto de dados comum, utilizando o mesmo conjunto de dados que foi empregado na construção do nosso modelo, apresentado na figura 4. O método tradicional selecionado para comparação é o utilizando o *software* IQ-TREE, que é um estimador de máxima verossimilhança de alta performance, frequentemente empregado na filogenia molecular. (60)

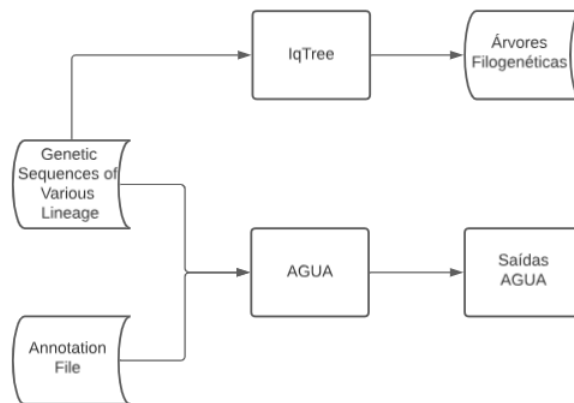
A escolha do IQ-TREE como método tradicional se baseia em sua prevalência na comunidade científica e sua eficácia comprovada em construir árvores filogenéticas a partir de dados de sequenciamento. A avaliação comparativa entre o método proposto e o IQ-TREE nos permitirá avaliar a capacidade do nosso modelo em produzir resultados relevantes e precisos em comparação com uma abordagem estabelecida.

Nesta análise comparativa, examinaremos aspectos críticos da construção de árvores filogenéticas, como a topologia das árvores resultantes, a robustez das ramificações, e a resolução de agrupamentos de espécies. Além disso, consideraremos aspectos de escalabilidade e eficiência computacional.

A abordagem metodológica consiste em utilizar o mesmo conjunto de dados que alimentou nosso modelo para a construção de árvores filogenéticas usando o IQ-TREE como

apresentado na figura 14. Comparamos, então, as árvores filogenéticas obtidas por ambos os métodos, avaliando suas similaridades e diferenças. Essa análise comparativa nos permitirá determinar se o método proposto representa uma melhoria significativa em relação à abordagem tradicional, contribuindo assim para o avanço no campo da filogenia molecular.

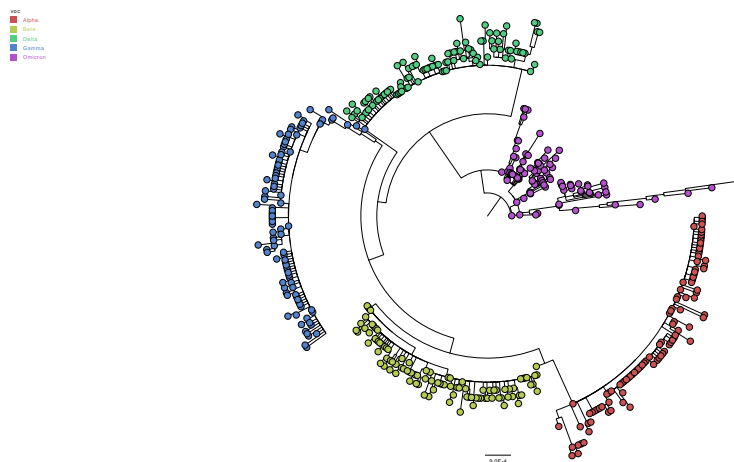
Figura 14 – Arquivos de entrada do AGUA e do IQ-TREE.



Fonte: O Autor

No contexto da análise comparativa realizada, o IQ-TREE foi aplicado ao mesmo conjunto de dados utilizado na construção do modelo proposto. Isso permitiu a geração de árvores filogenéticas com as linhagens corretamente separadas, como visto na figura 15, que serviram como ponto de comparação para avaliar o desempenho do método proposto em relação a uma abordagem tradicional.

Figura 15 – Árvore Filogenética Construída com o IQ-TREE.



Fonte: O Autor

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estágio avançado do projeto, podemos destacar que alcançamos marcos significativos no desenvolvimento de nossa ferramenta de análise de genes virais com base no uso de codons para classificação não supervisionada. Ao longo deste processo, enfrentamos desafios técnicos e científicos, e estamos progredindo de maneira consistente em direção à conclusão do projeto.

Primeiramente, concluímos com sucesso a montagem do dataset, um dos passos fundamentais para o desenvolvimento do nosso método. Utilizando técnicas de download de forma automatizada, para baixar as sequências classificadas de genoma completo do vírus a partir da base de dados pública BV-BRC, fomos capazes de construir um conjunto de dados abrangente e representativo. Além disso, implementamos um procedimento de filtragem rigoroso para selecionar apenas sequências únicas, garantindo a qualidade dos dados utilizados em nossa análise.

Além disso, desenvolvemos um conjunto de etapas para o processamento das sequências genéticas, incluindo o alinhamento com a ferramenta Minimap2, a extração de genes de interesse usando o conceito de ‘isca’ e a remoção de sequências duplicadas. Essas etapas são cruciais para preparar os dados de maneira adequada para análise subsequente.

O desenvolvimento do modelo de classificação não supervisionada também foi concluído com sucesso, permitindo-nos traduzir sequências de DNA em codons e extrair códigos únicos com base nas posições com codons distintos. Isso estabelece as bases para o nosso método de agrupamento e classificação.

Neste ponto, estamos nos estágios finais do projeto, com apenas uma etapa pendente. A finalização de um script que será utilizado para a comparação entre o método desenvolvido e um método tradicional está em andamento. Esta etapa é crucial para avaliar a eficácia e a precisão de nossa abordagem em relação às técnicas clássicas de filogenética. Após a finalização deste script, realizaremos a execução completa do método com o dataset completo, possibilitando uma avaliação abrangente.

Além disso, continuaremos a monitorar de perto o custo computacional, prestando atenção especial ao tempo necessário para classificar as sequências. Essa informação será valiosa para avaliar a escalabilidade e a eficiência do nosso método.

Em resumo, estamos avançando de maneira sólida e estruturada em direção aos objetivos de nosso projeto. Com a conclusão iminente da etapa final e a execução com o dataset completo, estamos ansiosos para avaliar os resultados e contribuir para a pesquisa em genética viral e análise filogenética.

Esta conclusão reflete o progresso atual do projeto, destacando as realizações e as etapas futuras para atingir os objetivos finais.

REFERÊNCIAS

- 1 BINSFELD, P. C.; COLONELLO, N. A. Coronavirus - sars-cov-2: Risk group and biosafety consensus for laboratory with infectious samples. **SciELO Preprints**, May 2020. Disponível em: <https://preprints.scielo.org/index.php/scielo/preprint/view/399>.
- 2 BEHL, A.; NAIR, A.; MOHAGAONKAR, S.; YADAV, P.; GAMBHIR, K.; TYAGI, N.; SHARMA, R. K.; BUTOLA, B. S.; SHARMA, N. Threat, challenges, and preparedness for future pandemics: A descriptive review of phylogenetic analysis based predictions. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 98, p. 105217, mar. 2022. ISSN 15671348. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567134822000144>.
- 3 COLLABORATIVE, G. C. C. SARS-CoV-2 vaccination modelling for safe surgery to save lives: data from an international prospective cohort study. **British Journal of Surgery**, v. 108, n. 9, p. 1056–1063, 03 2021. ISSN 0007-1323. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bjs/zxab101>.
- 4 DEIGIN, Y.; SEGRETO, R. Sars-cov-2's claimed natural origin is undermined by issues with genome sequences of its relative strains. **BioEssays**, v. 43, 05 2021.
- 5 KUCHIPUDI, S.; NAIR, M. S.; RUDEN, R.; YON, M.; NISSLY, R.; VANDEGRIFT, K.; NELLI, R.; LI, L.; JAYARAO, B.; MARANAS, C.; LEVINE, N.; WILLGERT, K.; CONLAN, A.; OLSEN, R.; DAVIS, J.; MUSSER, J.; HUDSON, P.; KAPUR, V. Multiple spillovers from humans and onward transmission of sars-cov-2 in white-tailed deer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 119, p. e2121644119, 02 2022.
- 6 MADHI, S.; BAILLIE, V.; CUTLAND, C.; VOYSEY, M.; KOEN, A.; FAIRLIE, L.; PADAYACHEE, S.; DHEDA, K.; BARNABAS, S.; BHORAT, Q.; BRINER, C.; KWATRA, G.; AHMED, K.; ALEY, P.; BHIKHA, S.; BHIMAN, J.; BHORAT, A.; PLESSIS, J.; ESMAIL, A.; IZU, A. Efficacy of the chadox1 ncov-19 covid-19 vaccine against the b.1.351 variant. **New England Journal of Medicine**, v. 384, 03 2021.
- 7 World Health Organization. **COVID-19 Dashboard**. último acesso em 20 de nov. de 2023. Disponível em: <https://covid19.who.int/>.
- 8 MADHI, S.; BAILLIE, V.; CUTLAND, C.; VOYSEY, M.; KOEN, A.; FAIRLIE, L.; PADAYACHEE, S.; DHEDA, K.; BARNABAS, S.; BHORAT, Q.; BRINER, C.; KWATRA, G.; AHMED, K.; ALEY, P.; BHIKHA, S.; BHIMAN, J.; BHORAT, A.; PLESSIS, J.; ESMAIL, A.; IZU, A. Efficacy of the chadox1 ncov-19 covid-19 vaccine against the b.1.351 variant. **New England Journal of Medicine**, v. 384, 03 2021.
- 9 WAGNER, E. K.; HEWLETT, M. J.; BLOOM, D. C.; CAMERINI, D. **Basic Virology, 3rd Edition**. 3. ed. [S.l.]: Wiley-Blackwell, 2007. ISBN 1405147156; 9781405147156.
- 10 FLORES, E.; WEIBLEN, R.; GIL, L.; TOBIAS, F.; LIMA, M.; GARCEZ, D.; BOTTON, S. Diversidade antigênica de amostras do vírus da diarreia viral bovina isoladas no brasil: implicações para o diagnóstico e estratégias de imunização. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, SciELO Brasil, v. 52, p. 11–17, 2000.

- 11 SANTOS, C. M. D.; KLASSA, B. Sistemática filogenética hennigiana: revolução ou mudança no interior de um paradigma? **Scientiae Studia**, v. 10, n. 3, p. 593–612, 2012.
- 12 RIBAS, G. C. Considerações sobre a evolução filogenética do sistema nervoso, o comportamento e a emergência da consciência. **Brazilian Journal of Psychiatry**, SciELO Brasil, v. 28, p. 326–338, 2006.
- 13 ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**. 4th edition. ed. New York: Garland Science, 2002. ISBN 978-0815344643.
- 14 GLICK, C. L. P. B. R. **Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA, 6th Edition**. 6. ed. [S.l.]: Wiley, 2022. ISBN 9781683673644; 1683673646; 9781683673651; 1683673654; 9781683673668; 1683673662.
- 15 HALL, B. G.; BARLOW, M. Phylogenetic analysis as a tool in molecular epidemiology of infectious diseases. **Annals of Epidemiology**, v. 16, n. 3, p. 157–169, 2006. ISSN 1047-2797. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1047279705001080>.
- 16 MORRISON, D. A. Tree Thinking: An Introduction to Phylogenetic Biology. David A. Baum and Stacey D. Smith. **Systematic Biology**, v. 62, n. 4, p. 634–637, 05 2013. ISSN 1063-5157. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/sysbio/syt026>.
- 17 FLINT, S. J.; RACANIELLO, V. R.; RALL, G. F.; SKALKA, A. M. **Principles of Virology**. 4th. ed. [S.l.]: ASM Press, 2015. ISBN 1555819516; 9781555819514.
- 18 JENSEN, F. **Introduction to Computational Chemistry**. 3rd. ed. [S.l.]: Wiley, 2017.
- 19 BROWN, T. A. **Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction**. 8. ed. [S.l.]: Wiley-Blackwell, 2020. ISBN 9781119640783; 1119640784.
- 20 ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. [S.l.]: Artmed, 2017.
- 21 OPENSTAX. **The Genetic Code**. último acesso em 05 de jul. de 2023. <https://openstax.org/books/biology/pages/15-1-the-genetic-code>.
- 22 JAIN, M.; OLSEN, H. E.; PATEN, B.; AKESON, M. The oxford nanopore minion: delivery of nanopore sequencing to the genomics community. **Genome Biology**, v. 17, n. 1, p. 239, 2016.
- 23 SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. Dna sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1977.
- 24 GOODWIN, S.; MCPHERSON, J. D.; MCCOMBIE, W. R. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, n. 6, p. 333–351, 2016.
- 25 KNIPE, P. M. H. D. M. **Fields Virology**. 6. ed. [S.l.]: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, 2022. Vol I and II. ISBN 9781451105636, 1451105630, 2013003842.
- 26 ZHU, N.; ZHANG, D.; WANG, W.; LI, X.; YANG, B.; SONG, J.; AL. et. A novel coronavirus from patients with pneumonia in china, 2019. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 8, p. 727–733, 2020.

- 27 WU, F.; ZHAO, S.; YU, B.; CHEN, Y. M.; WANG, W.; SONG, Z. G.; AL. et. A new coronavirus associated with human respiratory disease in china. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 265–269, 2020.
- 28 LI, G.; FAN, Y.; LAI, Y.; HAN, T.; LI, Z.; ZHOU, P.; PAN, P.; WANG, W.; HU, D.; LIU, X.; ZHANG, Q.; WU, J. Coronavirus infections and immune responses. **J Med Virol**, v. 92, n. 4, p. 424–432, Apr 2020.
- 29 FELSENSTEIN, J. **Inferring Phylogenies**. 2. ed. [S.l.]: Sinauer Associates, 2004. ISBN 0878931775,9780878931774.
- 30 SWOFFORD, D. L.; OLSEN, G. J.; WADDELL, P. J.; HILLIS, D. M. Phylogenetic inference. In: HILLIS, D. M.; MORITZ, C.; MABLE, B. K. (Ed.). **Molecular Systematics**. [S.l.]: Sinauer Associates, 1996. p. 407–514.
- 31 SOKAL, R. R.; MICHENER, C. D. A statistical method for evaluating systematic relationships. **University of Kansas Science Bulletin**, v. 38, n. 22, p. 1409–1438, 1958.
- 32 FITCH, W. M. Toward defining the course of evolution: Minimum change for a specific tree topology. **Systematic Biology**, v. 20, n. 4, p. 406–416, 1971.
- 33 FELSENSTEIN, J. Evolutionary trees from dna sequences: A maximum likelihood approach. **Journal of Molecular Evolution**, v. 17, n. 6, p. 368–376, 1981.
- 34 SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 406–425, 1987.
- 35 HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F.; NIELSEN, R.; BOLLBACK, J. P. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. **Science**, v. 294, n. 5550, p. 2310–2314, 2001.
- 36 KINGMAN, J. F. The coalescent. **Stochastic Processes and their Applications**, v. 13, n. 3, p. 235–248, 1982.
- 37 HUSON, D. H.; BRYANT, D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, n. 2, p. 254–267, 2006.
- 38 EISEN, J. A. Horizontal gene transfer among bacteria and its role in biological evolution. **Life on Earth: An Encyclopedia of Biodiversity, Ecology, and Evolution**, v. 19, p. 237–245, 2000.
- 39 RAMBAUT, A.; HOLMES, E. C.; O'TOOLE, Á.; HILL, V.; MCCRONE, J. T.; RUIS, C.; PLESSIS, L. du; PYBUS, O. G. A dynamic nomenclature proposal for sars-cov-2 lineages to assist genomic epidemiology. **Nature Microbiology**, Nature Publishing Group, v. 5, n. 11, p. 1403–1407, 2020.
- 40 World Health Organization. **Tracking SARS-CoV-2 variants**. último acesso em 08 de nov. de 2023. Disponível em: <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>.
- 41 FALL, A.; ELAWAR, F.; HODCROFT, E. B.; JALLOW, M. M.; TOURE, C. T.; BARRY, M. A.; KIORI, D. E.; SY, S.; DIAW, Y.; GOUDIABY, D.; NIANG, M. N.; DIA, N. Genetic diversity and evolutionary dynamics of respiratory syncytial virus over eleven consecutive years of surveillance in Senegal. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 91, p. 104864, jul. 2021. ISSN 15671348. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567134821001611>.

- 42 SHABBIR, M. Z.; RAHMAN, A.-u.; MUNIR, M. A comprehensive global perspective on phylogenomics and evolutionary dynamics of Small ruminant morbillivirus. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 17, dez. 2020. ISSN 2045-2322. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41598-019-54714-w>.
- 43 HUDU, S. A.; NIAZLIN, M. T.; NORDIN, S. A.; HARMAL, N. S.; TAN, S. S.; OMAR, H.; SHAHAR, H.; MUTALIB, N. A.; SEKAWI, Z. Hepatitis E virus isolated from chronic hepatitis B patients in Malaysia: Sequences analysis and genetic diversity suggest zoonotic origin. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 54, n. 4, p. 487–494, dez. 2018. ISSN 2090-5068, 2090-5076. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1016/j.ajme.2017.07.003>.
- 44 SALLARD, E.; HALLOY, J.; CASANE, D.; DECROLY, E.; HELDEN, J. van. Tracing the origins of SARS-COV-2 in coronavirus phylogenies: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 19, n. 2, p. 769–785, abr. 2021. ISSN 1610-3653, 1610-3661. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s10311-020-01151-1>.
- 45 PAEZ-ESPINO, D.; ZHOU, J.; ROUX, S.; NAYFACH, S.; PAVLOPOULOS, G. A.; SCHULZ, F.; MCMAHON, K. D.; WALSH, D.; WOYKE, T.; IVANOVA, N. N.; ELOE-FADROSH, E. A.; TRINGE, S. G.; KYRPIDES, N. C. Diversity, evolution, and classification of virophages uncovered through global metagenomics. **Microbiome**, v. 7, n. 1, p. 157, dez. 2019. ISSN 2049-2618. Disponível em: <https://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40168-019-0768-5>.
- 46 TANG, X.; YING, R.; YAO, X.; LI, G.; WU, C.; TANG, Y.; LI, Z.; KUANG, B.; WU, F.; CHI, C.; DU, X.; QIN, Y.; GAO, S.; HU, S.; MA, J.; LIU, T.; PANG, X.; WANG, J.; ZHAO, G.; TAN, W.; ZHANG, Y.; LU, X.; LU, J. Evolutionary analysis and lineage designation of SARS-CoV-2 genomes. **Science Bulletin**, v. 66, n. 22, p. 2297–2311, nov. 2021. ISSN 20959273. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2095927321001250>.
- 47 CHO, M.; MIN, X.; SON, H. S. Analysis of evolutionary and genetic patterns in structural genes of primate lentiviruses. **Genes & Genomics**, v. 44, n. 7, p. 773–791, jul. 2022. ISSN 1976-9571, 2092-9293. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s13258-022-01257-6>.
- 48 YIN, Y.; HE, K.; WU, B.; XU, M.; DU, L.; LIU, W.; LIAO, P.; LIU, Y.; HE, M. A systematic genotype and subgenotype re-ranking of hepatitis B virus under a novel classification standard. **Heliyon**, v. 5, n. 10, p. e02556, out. 2019. ISSN 24058440. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405844019362164>.
- 49 BEDOYA-PILOZO, C. H.; MAGÜES, L. G. M.; ESPINOSA-GARCÍA, M.; SÁNCHEZ, M.; VALDIVIEZO, J. V. P.; MOLINA, D.; IBARRA, M. A.; QUIMIS-PONCE, M.; ESPAÑA, K.; MACIAS, K. E. P.; FLORES, N. V. C.; ORLANDO, S. A.; PENAHERRERA, J. A. R.; CHEDRAUI, P.; ESCOBAR, S.; CHANGO, R. D. L.; RAMIREZ-MORÁN, C.; ESPINOZA-CAICEDO, J.; SÁNCHEZ-GILER, S.; LIMIA, C. M.; ALEMÁN, Y.; SOTO, Y.; KOURI, V.; CULASSO, A. C.; BADANO, I. Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of human papillomavirus infection in women with cervical lesions and cancer from the coastal region of Ecuador. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 50, n. 2, p. 136–146, abr. 2018. ISSN 03257541. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0325754117301372>.
- 50 POTDAR, V.; VIPAT, V.; RAMDASI, A.; JADHAV, S.; PAWAR-PATIL, J.; WALIMBE, A.; PATIL, S.; CHOUDHURY, M.; SHASTRI, J.; AGRAWAL, S.; PAWAR, S.; LOLE, K.; ABRAHAM, P.; CHERIAN, S. Phylogenetic classification of the whole-genome sequences of

SARS-CoV-2 from India & evolutionary trends. **Indian Journal of Medical Research**, v. 153, n. 1, p. 166, 2021. ISSN 0971-5916. Disponível em: https://journals.lww.com/ijmr/Fulltext/2021/01000/Phylogenetic_classification_of_the_whole_genome.14.aspx.

51 LICHTBLAU, D. Alignment-free genomic sequence comparison using FCGR and signal processing. **BMC Bioinformatics**, v. 20, n. 1, p. 742, dez. 2019. ISSN 1471-2105. Disponível em: <https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12859-019-3330-3>.

52 KIM, J.; CHEON, S.; AHN, I. NGS data vectorization, clustering, and finding key codons in SARS-CoV-2 variations. **BMC Bioinformatics**, v. 23, n. 1, p. 187, dez. 2022. ISSN 1471-2105. Disponível em: <https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12859-022-04718-7>.

53 DIMITROV, K. M.; ABOLNIK, C.; AFONSO, C. L.; ALBINA, E.; BAHL, J.; BERG, M.; BRIAND, F.-X.; BROWN, I. H.; CHOI, K.-S.; CHVALA, I.; DIEL, D. G.; DURR, P. A.; FERREIRA, H. L.; FUSARO, A.; GIL, P.; GOUGOULOVA, G. V.; GRUND, C.; HICKS, J. T.; JOANNIS, T. M.; TORCHETTI, M. K.; KOLOSOV, S.; LAMBRECHT, B.; LEWIS, N. S.; LIU, H.; LIU, H.; MCCULLOUGH, S.; MILLER, P. J.; MONNE, I.; MULLER, C. P.; MUNIR, M.; REISCHAK, D.; SABRA, M.; SAMAL, S. K.; ALMEIDA, R. Servan de; SHITTU, I.; SNOECK, C. J.; SUAREZ, D. L.; BORM, S. V.; WANG, Z.; WONG, F. Y. Updated unified phylogenetic classification system and revised nomenclature for Newcastle disease virus. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 74, p. 103917, out. 2019. ISSN 15671348. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567134819301388>.

54 PEFFERS, K.; TUUNANEN, T.; ROTHENBERGER, M. A.; CHATTERJEE, S. A design science research methodology for information systems research. **Journal of management information systems**, Taylor & Francis, v. 24, n. 3, p. 45–77, 2007.

55 SILVA, D. D.; LOPES, E. L.; JUNIOR, S. S. B. Pesquisa Quantitativa: Elementos, Paradigmas e Definições. **Revista de Gestão e Secretariado**, v. 05, n. 01, p. 01–18, abr. 2014. ISSN 21789010, 21789010. Disponível em: <http://www.revistagesec.org.br/ojs-2.4.5/index.php/secretariado/article/view/297>.

56 ROSSUM, G. van. **Python Programming Language**. Python Software Foundation, 1991. Disponível em: <https://www.python.org/>.

57 JUPYTER, P. **Jupyter Notebook: Interactive Computing**. [S.l.], 2001. Disponível em: <https://jupyter.org/>.

58 COCK, P. J. A.; ANTAO, T.; CHANG, J. T.; CHAPMAN, B. A.; COX, C. J.; DALKE, A.; FRIEDBERG, I.; HAMELRYCK, T.; KAUFF, F.; WILCZYNSKI, B.; HOON, M. J. L. de. Biopython: freely available python tools for computational molecular biology and bioinformatics. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p. 1422–1423, 2009.

59 MUTHUKADAN, B. **Selenium with Python**. [S.l.]. Disponível em: <https://selenium-python.readthedocs.io/>.

60 MINH, B. Q.; SCHMIDT, H. A.; CHERNOMOR, O.; SCHREMPF, D.; WOODHAMS, M. D.; HAESELER, A. von; LANFEAR, R. IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. **Molecular Biology and Evolution**, v. 37, n. 5, p. 1530–1534, 02 2020. ISSN 0737-4038. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>.