



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, BAHIA, BRASIL

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, BAHIA, BRASIL

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.	19
Figura 3 – Estrutura do coronavírus.	20
Figura 4 – Pipeline de Download das Sequências Genômicas.	25
Figura 5 – Dataset de sequências genômicas.	26
Figura 6 – Pipeline de Filtragem de Sequências Genômicas Duplicadas.	27
Figura 7 – Pipelines descontinuado.	27
Figura 8 – Arquivos de entrada do modelo.	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Informações do dataset de sequências genômicas.	25
Tabela 2 – Informações do dataset de teste de sequências genômicas.	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	adenina
BV-BRC	Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center
C	citossina
COVID-19	Coronavirus Disease 2019
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DSR	Design Science Research
G	guanina
GB	Gigabyte
MB	Megabyte
ML	Máxima Verossimilhança
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro (<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
RNA	Ácido Ribonucleico (<i>Ribonucleic Acid</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	19
2.2.1	SARS-CoV-2	20
2.3	Filogenia	20
3	DESCRIÇÃO DO PROJETO	22
3.1	Metodologia	22
3.2	Materiais e Métodos	23
3.3	Plano de Implementação	24
3.3.1	Montagem e Preparação do Dataset	24
3.3.2	Desenvolvimento do Modelo	28
3.3.3	Análise comparativa entre o método proposto e outro método existente: . . .	29
3.4	Resultados Obtidos	29
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	30
	REFERÊNCIAS	32

1 INTRODUÇÃO

Os problemas impostos pela pandemia do 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. 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 (1).

Diante disso, 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. Segundo Hall e Barlow(2) 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.”

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. 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) (3).

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(4) elas tem função importante porque apresentam de forma sucinta e particular a evolução dos descendentes partindo de ancestrais em comum.

Ao longo dos anos, vários métodos de 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. (5)
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. (6)
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. (7)
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. (8)
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. (9)
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. (10)
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. (11)

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. (12)

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 poderá 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. 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.

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 (1).

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. (2, p. 1) Além disso, por trabalhar com grandes quantidades de dados, os métodos utilizados devem ser avaliados também em relação ao seu custo computacional.

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.(1)
- Fall et al.(13)
- Shabbir et al.(14)
- Hudu et al.(15)
- Sallard et al.(16)
- Paez-Espino et al.(17)
- Tang et al.(18)
- Cho et al.(19)

Já em Yin et al.(20) e Bedoya-Pilozo et al.(21), 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.(22) 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(23) expõe o Frequency Chaos Game Representation e Kim et al.(24) a floresta aleatória. Por fim, Dimitrov et al.(25) comparou três modelos para reconstrução de árvores filogenéticas: junção de vizinhos; ML e inferência bayesiana.

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, que 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. Necessita-se então, de pesquisas e desenvolvimento de ferramentas que realizem uma classificação de sequências genéticas com base no uso/frequência 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 e validar 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 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.

Atingir o objetivo de desenvolver um método de construção de árvores com base nas distâncias obtidas a partir da diferença do uso de códons, contribuiria com a tarefa de classificação de cepas para 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. Os métodos atuais ainda demandam de um alto custo computacional, sendo assim, existe a necessidade de desenvolver outros mais baratos e que possam suportar o volume crescente de dados (sequências). Posto isso, 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. A hipótese referente à menor complexidade computacional do novo método deverá ser testada no trabalho.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 BIOLOGIA MOLECULAR

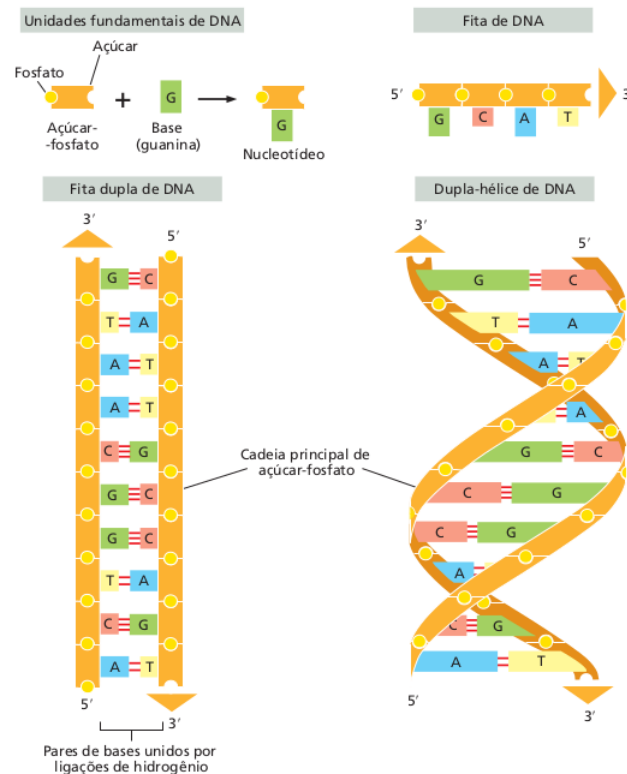
A Biologia Molecular é um ramo da biologia que lida e investiga os processos e mecanismos moleculares relacionados à estrutura, função e interações das biomoléculas presentes nos organismos vivos. Consiste principalmente em estudar as interações entre os vários sistemas da célula, partindo da relação 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.

A 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. (26)

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

Figura 1 – Estrutura do DNA.



Fonte: Retirada de Alberts et al.(26)

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 códon. Os códon são sequências de três nucleotídeos consecutivos no RNA que correspondem a um aminoácido específico. Existem 64 códon 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 códon no RNA é utilizada para sintetizar proteínas. Durante a tradução, os códon são reconhecidos por moléculas de RNA transportador (tRNA) que trazem os aminoácidos correspondentes.

A relação entre os códon, o DNA e o RNA é crucial para a síntese de proteínas e a expressão genética. O sequenciamento do DNA e a identificação dos códon 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*

Figura 2 – Tabela de Códon.

		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(27)

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 (26).

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 (28). 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 (3):

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 transcritas em moléculas de mRNA, que são

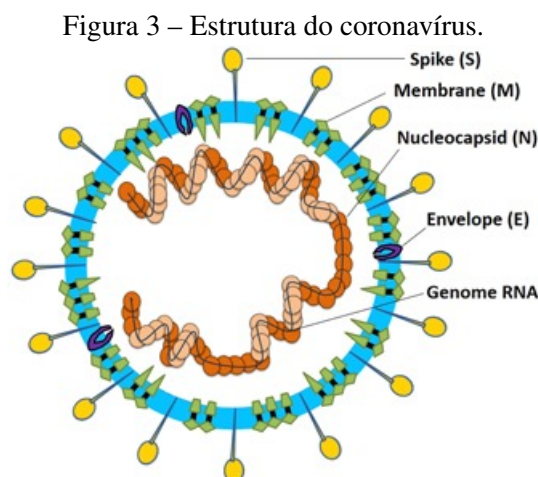
utilizadas para a síntese de proteínas virais.

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 Coronavirus Disease 2019 (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 (29, 30).

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), que são responsáveis pela ligação do vírus às células hospedeiras. 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.



Fonte: Retirada de Li et al.(31)

2.3 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 filogené-

tica molecular é uma abordagem utilizada para inferir a filogenia com base em informações moleculares, como sequências de DNA, RNA e proteínas(32).

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(33).

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 Design Science Research (DSR). Essa metodologia, proporciona um framework teórico e prático para a criação de artefatos inovadores, como métodos, modelos ou frameworks, visando resolver problemas específicos (34). 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.
2. Desenvolvimento dos artefatos.
3. Avaliação do artefato.
4. Apresentar contribuições científicas.

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. (35)

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. (36)

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 (37).

O python possui uma gama de bibliotecas que facilitam a implementação de soluções complexas. A seguir serão apresentadas a 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. (38)
- **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. (39)

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 todas 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

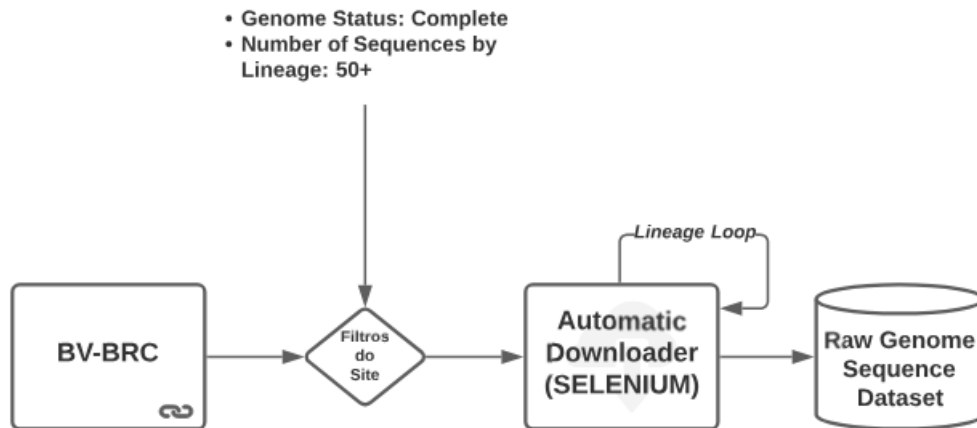
Para realizar o treinamento do modelo a ser construído, eram necessárias sequências únicas e alinhadas do gene Spike. Em vista disso, é importante salientar que o site Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (BV-BRC) disponibiliza sequências genômicas, e sendo assim, foi preciso construir 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 4. Isto posto, foi realizada uma sequência de passos conhecidos como *Web Scrapping* utilizando o Python juntamente com o Selenium, apresentados em seguida:

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.

Figura 4 – Pipeline de Download das Sequências Genômicas.



Fonte: O Autor

tica 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 , ..., Lineage L^n), contendo um arquivo nomeado BVBRC_genome_sequence.fasta, como apresentado na figura 5.

Ao finalizar o processo de download, o dataset completo ficou com as seguintes informações apresentadas na tabela 1.

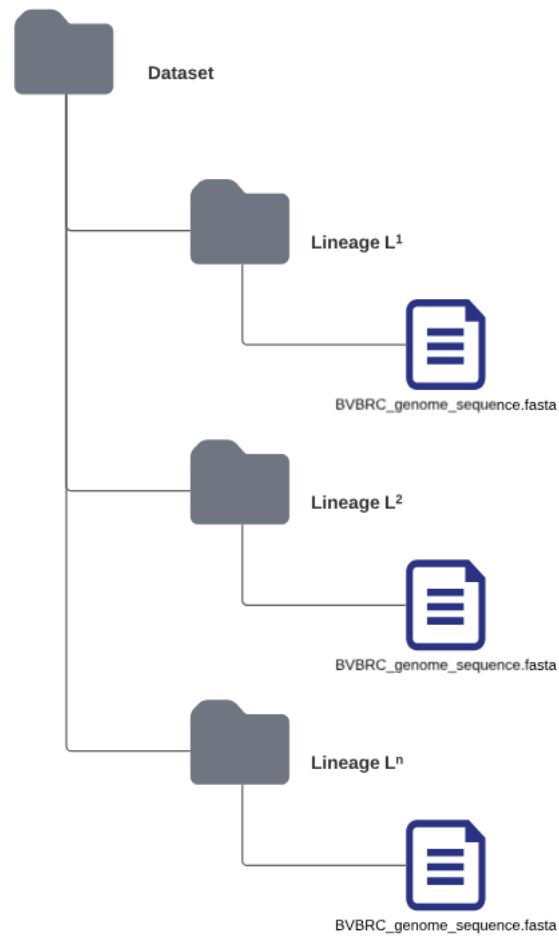
Tabela 1 – Informações do dataset de sequências genômicas.

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

Fonte: Criada pelo autor.

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

Figura 5 – Dataset de sequências genômicas.



Fonte: O Autor

Tabela 2 – Informações do dataset de teste de sequências genômicas.

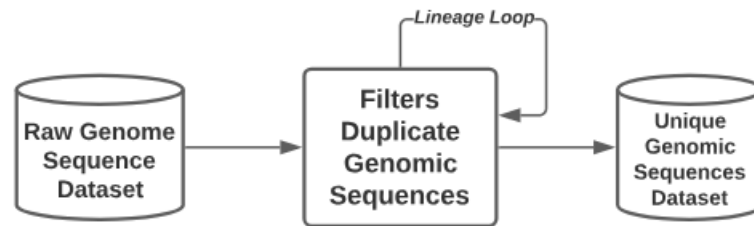
Pango	Organização Mundial da Saúde (<i>World Health Organization</i>) (WHO)	Quantidade de Sequê
B.1.1.7	Alpha	9982
B.1.1.529	Omicron	3694
B.1.351	Beta	5256
B.1.617.2	Delta	9996
P.1	Gamma	10000
Total		38928

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 6, gerando assim um novo dataset de sequências genômicas únicas.

Com o dataset de sequências únicas montado, foi decidido os passos a seguir, que

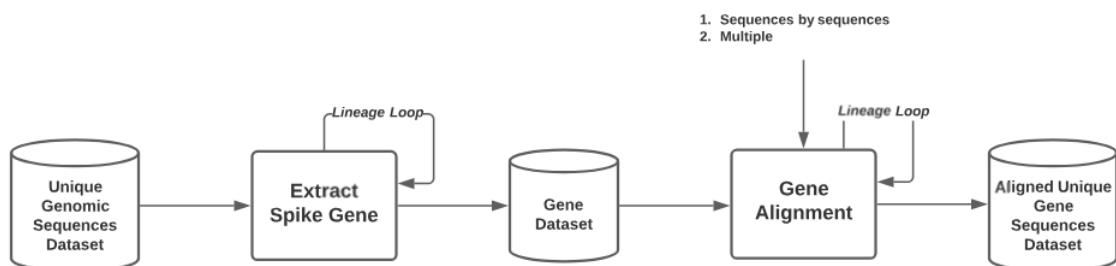
Figura 6 – Pipeline de Filtragem de Sequências Genômicas Duplicadas.



Fonte: O Autor

seriam executados com o papel de atingir o objetivo de obter o dataset de sequências gênicas únicas e alinhadas. Primeiro, como visto na figura 7, 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 7 – Pipelines descontinuado.



Fonte: O Autor

Após a análise com os orientadores, o processo, que continuou a partir das sequências genômicas únicas, foi feito da seguinte maneira:

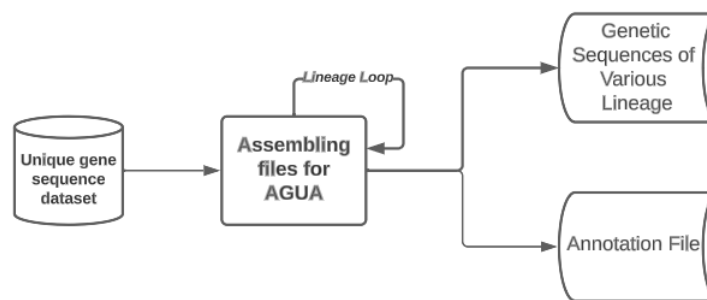
- Alinhamento das sequências genômicas.

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

- Extração do gene spike.
- Filtragem das sequências genicas repetidas.
- Filtragem das sequências genicas de má qualidade.

Ao final do processo, foi gerado um dataset contendo sequências gênicas únicas para as variantes alpha, beta, delta, gamma e omicron. A partir deste dataset, foi elaborado 2 (dois) arquivos, conforme a figura 8 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 8 – Arquivos de entrada do modelo.



Fonte: O Autor

3.3.2 Desenvolvimento do Modelo

Para o desenvolvimento do modelo foram realizados os seguintes passos:

- 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 e outro método existente:

Será realizada uma análise com um conjunto de dados, onde será realizado análises estatísticas para verificação de melhorias, ou não, do novo método proposto analisando os seguintes aspectos:

- Comparação dos métodos de agrupamento adotados, avaliando sua eficácia na formação de clusters e na identificação de padrões ou similaridades nas sequências.
- Avaliação do custo computacional (tempo de execução e recursos requeridos) para a classificação das sequências em cada método.
- Comparação da eficiência computacional entre os métodos, considerando a escalabilidade e o desempenho em grandes volumes de dados.

3.4 RESULTADOS OBTIDOS

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 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>>.
- 2 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>>.
- 3 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.
- 4 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>>.
- 5 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.
- 6 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.
- 7 FELSENSTEIN, J. Evolutionary trees from dna sequences: A maximum likelihood approach. **Journal of Molecular Evolution**, v. 17, n. 6, p. 368–376, 1981.
- 8 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.
- 9 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.
- 10 KINGMAN, J. F. The coalescent. **Stochastic Processes and their Applications**, v. 13, n. 3, p. 235–248, 1982.
- 11 HUSON, D. H.; BRYANT, D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, n. 2, p. 254–267, 2006.
- 12 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.
- 13 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>>.

14 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>>.

15 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>>.

16 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>>.

17 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>>.

18 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>>.

19 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>>.

20 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>>.

21 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>>.

- 22 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>.
- 23 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>>.
- 24 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>>.
- 25 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.; GOUJGOULOVA, 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>>.
- 26 ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. [S.l.]: Artmed, 2017.
- 27 OPENSTAX. **The Genetic Code**. último acesso em 05 de jul. de 2023. <<https://openstax.org/books/biology/pages/15-1-the-genetic-code>>.
- 28 KNIPE, P. M. H. D. M. **Fields Virology**. 6. ed. [S.l.]: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, 2022. Vol I and II. ISBN 9781451105636,1451105630,2013003842.
- 29 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.
- 30 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.
- 31 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.
- 32 FELSENSTEIN, J. **Inferring Phylogenies**. 2. ed. [S.l.]: Sinauer Associates, 2004. ISBN 0878931775,9780878931774.

- 33 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.
- 34 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.
- 35 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>>.
- 36 ROSSUM, G. van. **Python Programming Language**. Python Software Foundation, 1991. Disponível em: <<https://www.python.org/>>.
- 37 JUPYTER, P. **Jupyter Notebook: Interactive Computing**. [S.l.], 2001. Disponível em: <<https://jupyter.org/>>.
- 38 COCK, P. J. A.; ANTÃO, 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.
- 39 MUTHUKADAN, B. **Selenium with Python**. [S.l.]. Disponível em: <<https://selenium-python.readthedocs.io/>>.