Universidad Zaragoza
1542

Trabajo Fin de Grado

Reconstrucción computacional rápida de árboles filogenéticos de SARS-CoV-2

Autor

Óscar Gómez Ortego

Directores

Elvira Mayordomo Cámara

Mónica Hernández Giménez

ESCUELA DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA

2022

TRABAJOS DE FIN DE GRADO / FIN DE MÁSTER

Escuela de Ingeniería y Arquitectura Universidad Zaragoza

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD

(Este documento debe acompañar al Trabajo Fin de Grado (TFG)/Trabajo Fin de Máster (TFM) cuando sea depositado para su evaluación).

D./Dª. _____,

con nº de DNI _____ en aplicación de lo dispuesto en el art. 14 (Derechos de autor) del Acuerdo de 11 de septiembre de 2014, del Consejo de Gobierno, por el que se aprueba el Reglamento de los TFG y TFM de la Universidad de Zaragoza,

Declaro que el presente Trabajo de Fin de (Grado/Máster) _____, (Título del Trabajo)

_____

_____

_____

_____

_____

_____,

es de mi autoría y es original, no habiéndose utilizado fuente sin ser citada debidamente.

Zaragoza, _____

Fdo: _____

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Lorem ipsum dolor sit amet, consectetuer adipiscing elit. Aenean commodo ligula eget dolor. Aenean massa. Cum sociis natoque penatibus et magnis dis parturient montes, nascetur ridiculus mus. Donec quam felis, ultricies nec, pellentesque eu, pretium quis, sem. Nulla consequat massa quis enim. Donec pede justo, fringilla vel, aliquet nec, vulputate eget, arcu. In enim justo, rhoncus ut, imperdiet a, venenatis vitae, justo. Nullam dictum felis eu pede mollis pretium. Integer tincidunt. Cras dapibus. Vivamus elementum semper nisi. Aenean vulputate eleifend tellus. Aenean leo ligula, porttitor eu, consequat vitae, eleifend ac, enim. Aliquam lorem ante, dapibus in, viverra quis, feugiat a, tellus. Phasellus viverra nulla ut metus varius laoreet. Quisque rutrum. Aenean imperdiet. Etiam ultricies nisi vel augue. Curabitur ullamcorper ultricies nisi. Nam eget dui. Etiam rhoncus. Maecenas tempus, tellus eget condimentum rhoncus, sem quam semper libero, sit amet adipiscing sem neque sed ipsum. Nam quam nunc, blandit vel, luctus pulvinar, hendrerit id, lorem. Maecenas nec odio et ante tincidunt tempus. Donec vitae sapien ut libero venenatis faucibus. Nullam quis ante. Etiam sit amet orci eget eros faucibus tincidunt. Duis leo. Sed fringilla mauris sit amet nibh. Donec sodales sagittis magna. Sed consequat, leo eget bibendum sodales, augue velit cursus nunc,

y especialmente a los alumnos que hacen plantillas de LaTeX.

Título del resumen

RESUMEN

Una mañana, tras un sueño intranquilo, Gregorio Samsa se despertó convertido en un monstruoso insecto. Estaba echado de espaldas sobre un duro caparazón y, al alzar la cabeza, vio su vientre convexo y oscuro, surcado por curvadas callosidades, sobre el que casi no se aguantaba la colcha, que estaba a punto de escurrirse hasta el suelo. Numerosas patas, penosamente delgadas en comparación con el grosor normal de sus piernas, se agitaban sin concierto. - ¿Qué me ha ocurrido? No estaba soñando. Su habitación, una habitación normal, aunque muy pequeña, tenía el aspecto habitual. Sobre la mesa había desparramado un muestrario de paños - Samsa era viajante de comercio-, y de la pared colgaba una estampa recientemente recortada de una revista ilustrada y puesta en un marco dorado. La estampa mostraba a una mujer tocada con un gorro de pieles, envuelta en una estola también de pieles, y que, muy erguida, esgrimía un amplio manguito, asimismo de piel, que ocultaba todo su antebrazo. Gregorio miró hacia la ventana; estaba nublado, y sobre el cinc del alféizar repiqueteaban las gotas de lluvia, lo que le hizo sentir una gran melancolía. «Bueno -pensó-; ¿y si siguiese durmiendo un rato y me olvidase de

Índice

Capítulo 1

Introducción y objetivos

- Sobre el problema del calculo de filogenias
- Sobre las distancias de compresión
- Sobre el covid
  - frase sobre la historia
  - distancia por compresión
  - nextstrain
  - gisaid

La filogenética es una disciplina de la biología evolutiva que se ocupa de comprender las relaciones históricas entre diferentes grupos de organismos a partir de la distribución en un árbol o cladograma dicotómico de los caracteres derivados de un antecesor común a dos o más taxones que contiene aquellos caracteres en común. Esta se divide en varias ramas, la filogenética morfológica que simplemente establece la relaciones entre seres vivos en base a similitudes morfológicas o anatómicas y ,la que es la base de la bioinformática, la filogenética molecular, que investiga las relaciones mediante el análisis de secuencias de ADN, ARN o proteinas y que normalmente mediante algoritmos computacionales logra obtener estos árboles filogenéticos que representan una hipótesis evolutiva de un conjunto de genes, especies u otros taxones.

El método adoptado normalmente para la creación de filogenias está basado en el alineamiento múltiple de las secuencias de ADN o ARN, compuestas por los aminoacidos A,C,G,T en el caso de ADN y por A, C, G, U en el caso del ARN. Este método se basa en la inserción/borrado de aminoácidos entre el alfabeto comentado o la adición de gaps en las secuencias para lograr la optimización global del alineamiento. No obstante, dada la intratabilidad del problema MSA(multiple sequence alignment) y

su coste exponencial hace que normalmente se haga uso de heurísticas que encuentren una solución subóptima en un tiempo mucho menor.

El siguiente paso para la formación de filogenias aparecen dos vertientes, los basados en secuencias, funcionan generando todos los árboles posibles y eligiendo luego los más adecuados según los datos y otros parámetros previamente establecidos, entre los que están maxima verosimilitud y maxima parsimonia.

Y los basados en distancias, va implícito al alineamiento y se trata en establecer distancias entre las diferentes secuencias del alineamiento, crear una matriz con ellas y realizar un agrupamiento entre ellos. Los más conocidos son UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic) y Neighbor-joining.

Cual es el proposito del los metodos de compresion y en que se basa este. La idea que subyace en los métodos de compresión es librarse de los alineamientos y los inconvenientes que estos acarrean y calcular las distancias mediante algún algoritmo de compresión. En el caso de NCD(Normalized Compressed Distance) se trata de una aproximación de la NID(Normalized Information Distance) dada su intratabilidad, que se basa en la complejidad de Kolmogorov y sigue la siguiente fórmula:

$$NCD(x,y) = \frac{Z(xy) - min(Z(x), Z(y))}{max(Z(x), Z(y))}$$

Siendo $NCD(x,y)$ la distancia entre las cadenas x e y, $Z(x)$ el tamaño de la compresión de x, y $Z(xy)$ el tamaño de la compresión de la concatenación de x e y.

Tanto en el artículo original de Vitanyi(ref) y en la tesis de Vacca(ref) se exploran datasets de muy pocas secuencias. Vitanyi muestra árboles de como mucho 60 secuencias y Vacca habla de varios datasets de alrededor de 20 secuencias.

Aqui aparece la motivación de este trabajo, ampliar estos datasets de prueba, probar los límites de este algoritmo y compararlo con otros métodos de hoy en día como augur.

Sobre el covid

Capítulo 2

Despliegue y replicación del sistema

Podría dedicar este capítulo a explicar como repliqué el sistema y obtuve los mismos resultados que en el artículo original.

2.1. Una sección

Lorem ipsum dolor sit amet, consectetuer adipiscing elit. Aenean commodo ligula eget dolor. Aenean massa. Cum sociis natoque penatibus et magnis dis parturient montes, nascetur ridiculus mus. Donec quam felis, ultricies nec, pellentesque eu, pretium quis, sem. Nulla consequat massa quis enim. Donec pede justo, fringilla vel, aliquet nec, vulputate eget, arcu. In enim justo, rhoncus ut, imperdiet a, venenatis vitae, justo. Nullam dictum felis eu pede mollis pretium. Integer tincidunt. Cras dapibus. Vivamus elementum semper nisi. Aenean vulputate eleifend tellus. Aenean leo ligula, porttitor eu, consequat vitae, eleifend ac, enim. Aliquam lorem ante, dapibus in, viverra quis, feugiat a, tellus. Phasellus viverra nulla ut metus varius laoreet. Quisque rutrum. Aenean imperdiet. Etiam ultricies nisi vel augue. Curabitur ullamcorper ultricies nisi. Nam eget dui. Etiam rhoncus. Maecenas tempus, tellus eget condimentum rhoncus, sem quam semper libero, sit amet adipiscing sem neque sed ipsum. Nam quam nunc, blandit vel, luctus pulvinar, hendrerit id, lorem. Maecenas nec odio et ante tincidunt tempus. Donec vitae sapien ut libero venenatis faucibus. Nullam quis ante. Etiam sit amet orci eget eros faucibus tincidunt. Duis leo. Sed fringilla mauris sit amet nibh. Donec sodales sagittis magna. Sed consequat, leo eget bibendum sodales, augue velit cursus nunc,

NCD	virus name
0.00362117	selected_SARS_CoV_2_EPI_ISL_471246
0.018043	MN908947.3_alt._SARS_CoV_2
0.448319	BetaCoV/bat/Yunnan/RaTG13/2013—EPI_ISL_402131_EPI_ISL_402131
0.788278	MG772933.1_bat_SL_CoVZC45
0.79136	MG772934.1_bat_SL_CoVZXC21
0.917906	KF569996_Coronaviridae_785
0.918252	KC881006_Coronaviridae_783
0.918699	KC881005_Coronaviridae_782
0.919072	AY278554_Riboviria_2953
0.919083	AY278741_Riboviria_2954
0.919087	FJ882963_Coronaviridae_726
0.91914	EU371561_Riboviria_3205
0.919188	AY278488_Riboviria_2951
0.919244	AY278491_Riboviria_2952
0.919297	FJ882935_Coronaviridae_722
0.919359	EU371559_Riboviria_3203
0.919393	NC_004718_Coronaviridae_806
0.919429	EU371563_Riboviria_3207
0.919486	AY357075_Riboviria_2979
0.919486	AY350750_Riboviria_2977
0.91952	AY864805_Riboviria_3030
0.91952	DQ640652_Riboviria_3098
0.919556	EU371562_Riboviria_3206
0.919635	FJ882945_Coronaviridae_724
0.919762	EU371560_Riboviria_3204
0.919774	AY394850_Riboviria_2981
0.919807	AY864806_Riboviria_3031
0.919878	EU371564_Riboviria_3208
0.919934	FJ882942_Coronaviridae_723
0.920233	FJ882954_Coronaviridae_725
0.920315	AY357076_Riboviria_2980
0.920607	KF367457_Coronaviridae_784
0.921176	AY515512_Riboviria_2987
0.921888	JX993988_Coronaviridae_779
0.923151	GQ153542_Coronaviridae_750
0.923183	GQ153543_Coronaviridae_751
0.925293	GQ153547_Coronaviridae_755
0.925569	GQ153544_Coronaviridae_752
0.925569	GQ153545_Coronaviridae_753
0.925676	GQ153548_Coronaviridae_756
0.925686	DQ648857_Riboviria_3101
0.925737	GQ153539_Coronaviridae_747
0.925737	GQ153540_Coronaviridae_748
0.925854	GQ153546_Coronaviridae_754
0.925875	GQ153541_Coronaviridae_749
0.926775	JX993987_Coronaviridae_778
0.926957	DQ412043_Riboviria_3074
0.931991	DQ412042_Riboviria_3073
0.932947	DQ648856_Riboviria_3100
0.952368	NC_014470_Coronaviridae_823
0.994546	NC_025217_Coronaviridae_835
0.994986	JF705860_Coronaviridae_768
0.994986	AY646283_Riboviria_3003
0.995034	NC_034440_Coronaviridae_847
0.995078	EF065512_Riboviria_3126
0.995078	EF065511_Riboviria_3125
0.995078	EF065510_Riboviria_3124
0.995086	EF065505_Riboviria_3119
0.995086	EF065506_Riboviria_3120
0.995086	EF065507_Riboviria_3121

NCD	virus name
0.00388619	MN908947.3_alt._SARS_CoV_2
0.442193	BetaCoV/bat/Yunnan/RaTG13/2013—EPI_ISL_402131_EPI_ISL_402131
0.786061	MG772933.1_bat_SL_CoVZC45
0.789591	MG772934.1_bat_SL_CoVZXC21
0.915357	KC881006_Coronaviridae_783
0.915702	KF569996_Coronaviridae_785
0.915805	KC881005_Coronaviridae_782
0.91631	AY278554_Riboviria_2953
0.916483	AY278491_Riboviria_2952
0.916563	AY278488_Riboviria_2951
0.916621	DQ640652_Riboviria_3098
0.916632	NC_004718_Coronaviridae_806
0.916644	EU371561_Riboviria_3205
0.916724	AY350750_Riboviria_2977
0.916724	AY357075_Riboviria_2979
0.916736	AY278741_Riboviria_2954
0.916759	AY864805_Riboviria_3030
0.916794	EU371563_Riboviria_3207
0.916874	EU371559_Riboviria_3203
0.916921	EU371562_Riboviria_3206
0.917139	EU371560_Riboviria_3204
0.91715	FJ882945_Coronaviridae_724
0.917184	AY864806_Riboviria_3031
0.917288	AY394850_Riboviria_2981
0.917415	AY357076_Riboviria_2980
0.917418	EU371564_Riboviria_3208
0.917449	FJ882942_Coronaviridae_723
0.917704	FJ882963_Coronaviridae_726
0.918051	FJ882935_Coronaviridae_722
0.918304	KF367457_Coronaviridae_784
0.918829	AY515512_Riboviria_2987
0.919125	FJ882954_Coronaviridae_725
0.921528	GQ153543_Coronaviridae_751
0.921636	GQ153542_Coronaviridae_750
0.921721	JX993988_Coronaviridae_779
0.923894	DQ648857_Riboviria_3101
0.924052	GQ153547_Coronaviridae_755
0.924297	GQ153548_Coronaviridae_756
0.924328	GQ153545_Coronaviridae_753
0.924359	GQ153540_Coronaviridae_748
0.924466	GQ153544_Coronaviridae_752
0.924497	GQ153539_Coronaviridae_747
0.924614	GQ153546_Coronaviridae_754
0.924635	GQ153541_Coronaviridae_749
0.925028	DQ412043_Riboviria_3074
0.925885	JX993987_Coronaviridae_778
0.930059	DQ412042_Riboviria_3073
0.93074	DQ648856_Riboviria_3100
0.951006	NC_014470_Coronaviridae_823
0.994806	NC_025217_Coronaviridae_835
0.995086	EF065505_Riboviria_3119
0.995086	EF065506_Riboviria_3120
0.995086	EF065507_Riboviria_3121
0.995092	EF065508_Riboviria_3122
0.995172	NC_034440_Coronaviridae_847
0.995211	EF065512_Riboviria_3126
0.995211	EF065511_Riboviria_3125
0.995211	EF065510_Riboviria_3124
0.995227	DQ648794_Riboviria_3099
0.995259	NC_038294_Coronaviridae_850

NCD	virus name
0.00362117	selected_SARS_CoV_2_EPI_ISL_471246
0.0111034	MN908947.3_alt._SARS_CoV_2
0.444846	BetaCoV/bat/Yunnan/RaTG13/2013—EPI_ISL_402131_EPI_ISL_402131
0.788416	MG772933.1_bat_SL_CoVZC45
0.791082	MG772934.1_bat_SL_CoVZXC21
0.917493	KF569996_Coronaviridae_785
0.917563	KC881006_Coronaviridae_783
0.91801	KC881005_Coronaviridae_782
0.918257	FJ882963_Coronaviridae_726
0.918381	AY278554_Riboviria_2953
0.918447	EU371561_Riboviria_3205
0.918497	AY278488_Riboviria_2951
0.918531	AY278741_Riboviria_2954
0.918553	AY278491_Riboviria_2952
0.918565	NC_004718_Coronaviridae_806
0.918597	EU371563_Riboviria_3207
0.918605	FJ882935_Coronaviridae_722
0.918658	AY357075_Riboviria_2979
0.918669	EU371559_Riboviria_3203
0.918691	DQ640652_Riboviria_3098
0.918724	EU371562_Riboviria_3206
0.918796	AY350750_Riboviria_2977
0.918829	AY864805_Riboviria_3030
0.918945	FJ882945_Coronaviridae_724
0.919072	EU371560_Riboviria_3204
0.919117	AY864806_Riboviria_3031
0.919182	EU371564_Riboviria_3208
0.919221	AY394850_Riboviria_2981
0.919244	FJ882942_Coronaviridae_723
0.919486	AY357076_Riboviria_2980
0.91954	FJ882954_Coronaviridae_725
0.91993	KF367457_Coronaviridae_784
0.920486	AY515512_Riboviria_2987
0.921053	JX993988_Coronaviridae_779
0.923045	GQ153543_Coronaviridae_751
0.923151	GQ153542_Coronaviridae_750
0.92541	DQ648857_Riboviria_3101
0.925706	GQ153547_Coronaviridae_755
0.925802	JX993987_Coronaviridae_778
0.925844	GQ153544_Coronaviridae_752
0.925951	GQ153548_Coronaviridae_756
0.925982	GQ153545_Coronaviridae_753
0.926013	GQ153540_Coronaviridae_748
0.92613	GQ153546_Coronaviridae_754
0.92615	GQ153541_Coronaviridae_749
0.92615	GQ153539_Coronaviridae_747
0.926681	DQ412043_Riboviria_3074
0.931577	DQ412042_Riboviria_3073
0.932533	DQ648856_Riboviria_3100
0.952228	NC_014470_Coronaviridae_823
0.994546	NC_025217_Coronaviridae_835
0.994897	NC_034440_Coronaviridae_847
0.994986	FJ938057_Coronaviridae_734
0.994986	AY646283_Riboviria_3003
0.995078	EF065510_Riboviria_3124
0.995078	EF065511_Riboviria_3125
0.995078	EF065512_Riboviria_3126
0.995086	EF065506_Riboviria_3120
0.995086	EF065505_Riboviria_3119
0.995086	EF065507_Riboviria_3121

Capítulo 3

Comparación de los resultados obtenidos con el estado del arte

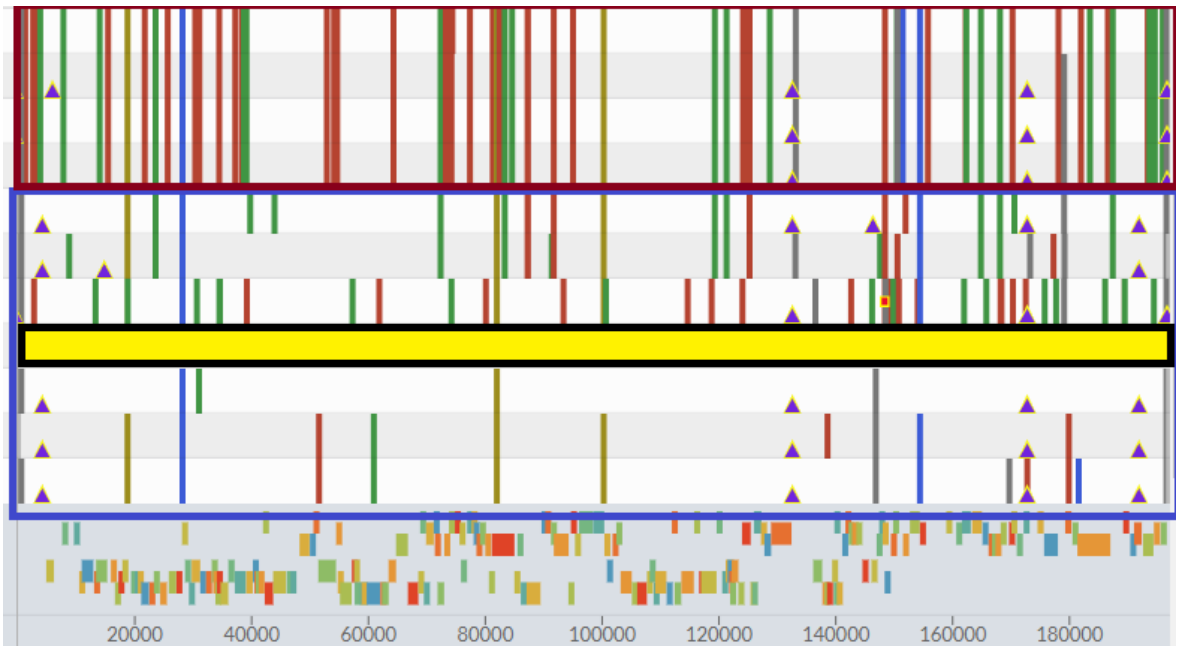
3.0.1. Criterios de comparación

Para la comparación de los árboles filogenéticos que se irán obteniendo a los largo del proyecto se van a realizar numerosos análisis:

- Análisis visual por clados: Un clado es una agrupación que contiene un antepasado común y todos los descendientes de ese antepasado, en filogenética se resume a cada rama del árbol que agrupa las distintas secuencias. Por ello y dependiendo de las mutaciones que vayan sucediendo en las secuencias, se le asigna un nombre a ramas/clados que comparten las mismas mutaciones con la idea de crear clusters visuales. Una de las maneras más sencillas de formar clados actualmente es mediante nextstrain y su herramienta nextclade.org que a grosso modo realiza Clade assignment, mutation calling, and sequence quality checks. Esta cuenta con diferentes datasets de algunos virus de la actualidad y al seleccionar un conjunto de secuencias como entrada las etiqueta y clasifica. Finalmente muestra en una tabla difentes datos sobre las secuencias y las mutaciones que han sufrido, en ciertos casos en los que el dataset es conocido como en el caso del covid o de monkeypox se podrá ver una vista contextual de las secuencias clasificadas en el actual árbol que maneja nextstrain(imagen disponible en el github) ¿Igual debería hacer el ejemplo sobre el covid?

  Para el análisis de árboles que ya hemos construido usaremos la herramienta auspice.us(también forma parte de nextstrain) que permite la exploración de datasets filogenéticos. Combinado con los metadatos que suelen proporcionar las diversas fuentes y la gran cantidad de filtros que ofrece auspice se puede observar

- Herramientas de comparación y visualización de árboles: a pesar de que hay



(a) Fragmento del análisis realizado por nextclade, en este caso sobre el virus monkeypox, que muestra las mutaciones que se van realizando a lo largo de las secuencias con respecto a la de referencia(la marcada en amarillo). En el rectángulo azul se puede observar que esas secuencias comparten la mayoría de mutaciones y pertenecen a un cluster similar, mientras que las secuencias en el rectángulo rojo comparten muchas más y pertenecen a otro cluster diferente

(b) Esquema de colores para el resaltado de las diferentes mutaciones en las secuencias

Figura 3.1: Captura del análisis realizado por nextclade.org

métricas asociadas a la comparación de árboles como la distancia robinson-foulds o la distancia de cuartetos que se puede calcular mediante el software visualtreecmp, dado que estas presentan ciertas desventajas e irregularidades se va a hacer uso de 2 herramientas de visualización.

Estas son phylo.io(ref) y iphyloC(ref). Son dos herramientas muy similares, están orientadas a la comparación de 2 árboles uno al lado del otro e implementan algunas características que son bastante útiles para el análisis, entre ellas está el resaltar las similitudes y diferencias entre dos árboles, identificación automática de la mejor coincidencia de orden de raíces y hojas, escalabilidad a árboles grandes...

3.1. Datos obtenidos de nextstrain

Para comparar el resultado obtenido de los 100 virus sars cov 2 más cercanos al de referencia Wuhan 2019 con los sistemas actuales hicimos 2 métodos. En primer lugar se comparó con un subconjunto de 479 secuencias que contienen las 100 elegidas por el programa y que contienen secuencias entre 12/2019 y 08/2021. En segundo lugar se comparó a nivel filogenético con el mismo conjunto de 100 secuencias seleccionadas pero se obtuvo la filogenia con uno de los métodos actuales, en este caso, con la herramienta MEGA mediante un alineamiento previo(una secuencia no se tuvo en cuenta), en este caso nextstrain.org ya proporcionaba la colección de secuencias alineadas por lo que la comparación en cuanto a tiempo no se tiene en cuenta.

??

3.1.1. Método 2

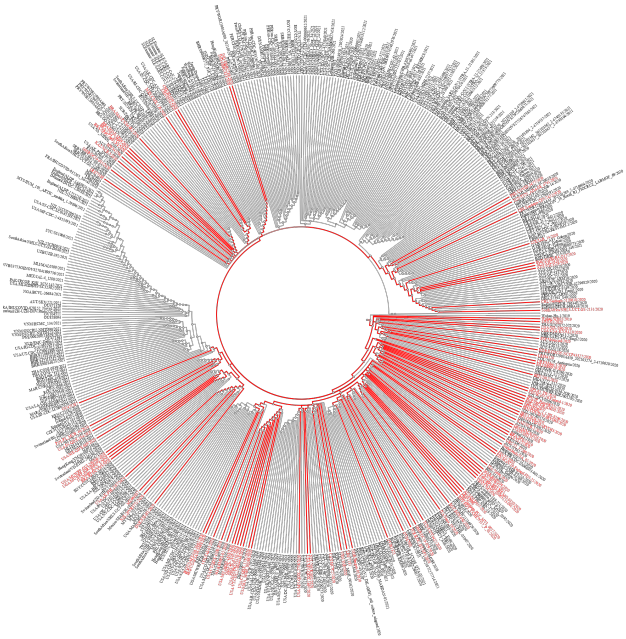
En este apartado compararemos la filogenia creada por NCD compuesta por las 100 secuencias más cercanas a la de referencia que en este caso es xxxxx y la filogenia resultante de realizar el método de maxima verosimilitud con el software mega sobre las secuencias ya alineadas que proporcionaba nexstrain. Añadiendo ambos árboles con los metadatos a auspice.us se puede ver que la clasificación en clados es bastante buena, cabe destacar que al ser solamente 100 secuencias de un conjunto de bastantes solo aparecen los clados 19.x y 20.x correspondientes a una etapa temprana del virus que se ubica en 2020. Se puede detectar en las secuencias del clado 20.C que hay un error en un par de hojas(COL/Cali-01/2020 y MAR/RMPS-05/2020) que se ubican entre variantes del clado 20.A.

3.2. Datos obtenidos de GISAID

En este caso obtenemos los datos de nexstrain.org pero estos pertenecen a Gisaid. Son datos pertenecientes a europa. Para esta prueba se elegiran 50 secuencias linealmente separadas, es decir, no se consideraran las n secuencias más próximas a la de referencia sino que se elegiran uniformemente entre las secuencias, con el objetivo de poner en contexto la mágnitud de ncd que se están comparando y que puedan aparecer otras secuencias de variantes más recientes en comparación con la de referencia.

A continuación se comparará

(a) Árbol salida



(b) Árbol subselección

Figura 3.2: Árbol salida del programa(a) y árbol con una subselección(b) de alrededor de 500 secuencias del conjunto inicial, en rojo las secuencias correspondientes al árbol a en ambos árboles

3.3. Escalabilidad y estudio del sistema

Tradicionalmente la creación de árboles filogenéticos de gran tamaño(10.000, 30.000, 100.000 secuencias...) ha supuesto un reto principalmente causado por uno de sus

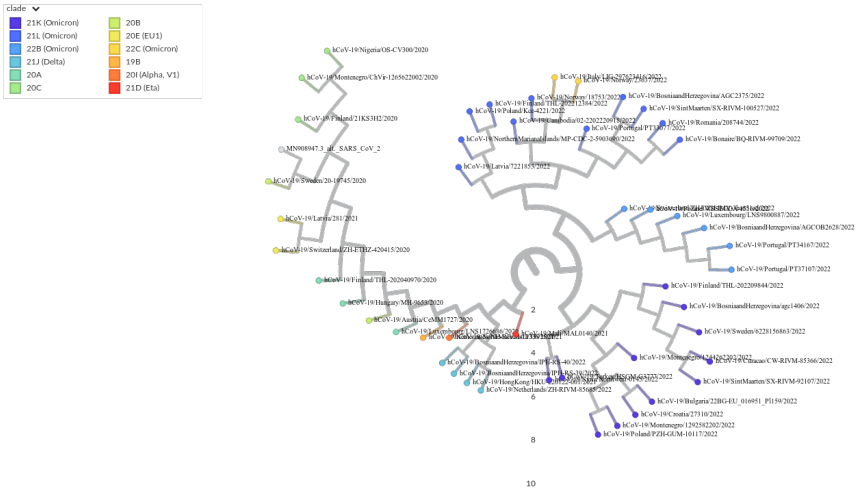


Figura 3.3: Árbol salida

necesarios precursores, el alineamiento múltiple de secuencias. The two issues of concern in reconstructing phylogenetic trees from large data matrices are computation time and reliability. Multiple sequence alignment, the necessary precursor to tree building, and phylogenetic inference are notoriously time-consuming computational problems. The running time, t, of a tree-building algorithm for some arbitrary data matrix is dependent mainly on the number of species, N, because t $\frac{1}{4}$ fN: The functional relationship, f, ranges from exponential for most treebuilding methods that rely on optimization, such as parsimony and maximum likelihood, to polynomial

Sobre el funcionamiento del sistema destacan 2 fases: el cálculo de la NCD de las distintas secuencias a la de referencia y el cálculo de la matriz de distancias entre las secuencias seleccionadas. En este primer paso se calcula la distancia NCD de todas las respuestas frente a la secuencia de referencia en todas las pruebas la secuencia de referencia que se ha usado es la de wuhan. El coste de este paso es t(paso1)= nseq * t(NCD) lo que en términos de o grande es O(n) siendo n el número de secuencias a analizar

Sobre el cálculo de la matriz de distancias con la que se obtendrá posteriormente la filogenia, constituye la parte más costosa del sistema. El tiempo de cálculo depende de 2 factores:

– el cálculo de la NCD entre 2 secuencias, que depende directamente de la longitud de las secuencias, en mi caso este cálculo con las secuencias de covid que tienen alrededor de 29500 carácteres tarda 0,3 segundos.

– El tamaño de la matriz de una forma exponencial, es decir, se realizarán nxn operaciones de cálculo de la NCD(en caso de que se aplique la optimización que se explica posteriormente se realizarían nxn/2)

la fórmula con la que se realizan las estimaciones del tiempo es: t(matriz) = t(NCD) * n * n y en términos de o grande establece un coste O(n2)

3.4. Optimización del sistema

El sistema está basado en una base de datos clave-valor, donde la clave es una tag que identifica de manera única a las secuencias/par de secuencias, y el valor que le corresponde es el tamaño comprimido. A nivel del calculo del tamaño de compresión no se encontró ninguna optimización posible, sin embargo, a la hora de crear la filogenia se debe establecer la NCD de todas con todas las secuencias como se observa en (foto) formando una matriz simétrica. Por lo tanto, no se deberían calcular los nxn valores de la matriz. Se descubrió que no se tenía en cuenta la simetría de la matriz, sino que siendo 2 secuencias s1 y s2 se calculaba la distancia s1-s2 y s2-s1 siendo esta prácticamente igual. Este caso se producía porque se guardaba en la base de datos como una tag ïd1+id2z a la hora de consultar si el tag se encontraba en la base no se tenía en cuenta el orden de las secuencias. Para comprobar que esta optimización realmente no alteraba los resultados originales se realizaron los árboles del árticulo original obteniendo exactamente los mismos resultados. Con esta sencilla mejora se logra reducir a la **mitad** el número de NCDs a calcular y por consiguiente el tiempo de ejecución total.

3.4.1. Uso de las distancias de compresión en árboles filogenéticos

El método de clustering del artículo original era el comando maketree(ref) que con la matriz de distancias como entrada realiza el Minimum Cost Quartet Tree Reconstruction method.The program starts with a random tree, and continues to try small modifications to improve the tree score. Eventually, the tree will stop easily improving.

El problema con el método de clústering era que se llegaba a una salida en la que el árbol solo representaba el orden parcial de las secuencias ya que las ramas no

tienen longitud, por tanto, en la parte relacional el clustering era correcto pero en la representación no se tenían en cuenta las distancias entre los diferentes clusters y a la hora de comparar con árboles actuales no se identificaban facilmente.

Para solucionar este problema se pensó en usar el método Neighbor joining ya que se adapta perfectamente a nuestro caso de uso, requiere una matriz de distancias como entrada y proporciona un árbol con las longitudes de las ramas.

Para adaptar la matriz de distancias del método NCD como entrada a MEGA se necesita un poco de postprocesado, esto es, transformar la matriz en triangular inferior y adaptarla al fichero de que requiere mega (formato .meg). Este postprocesado se realiza mediante un script propio.

A continuación se muestran algunos ejemplos de las diferencias en los mismos árboles agrupados con los dos métodos: y con NCD: y el árbol original en https://nextstrain.org/monkeypox/hmpxv1

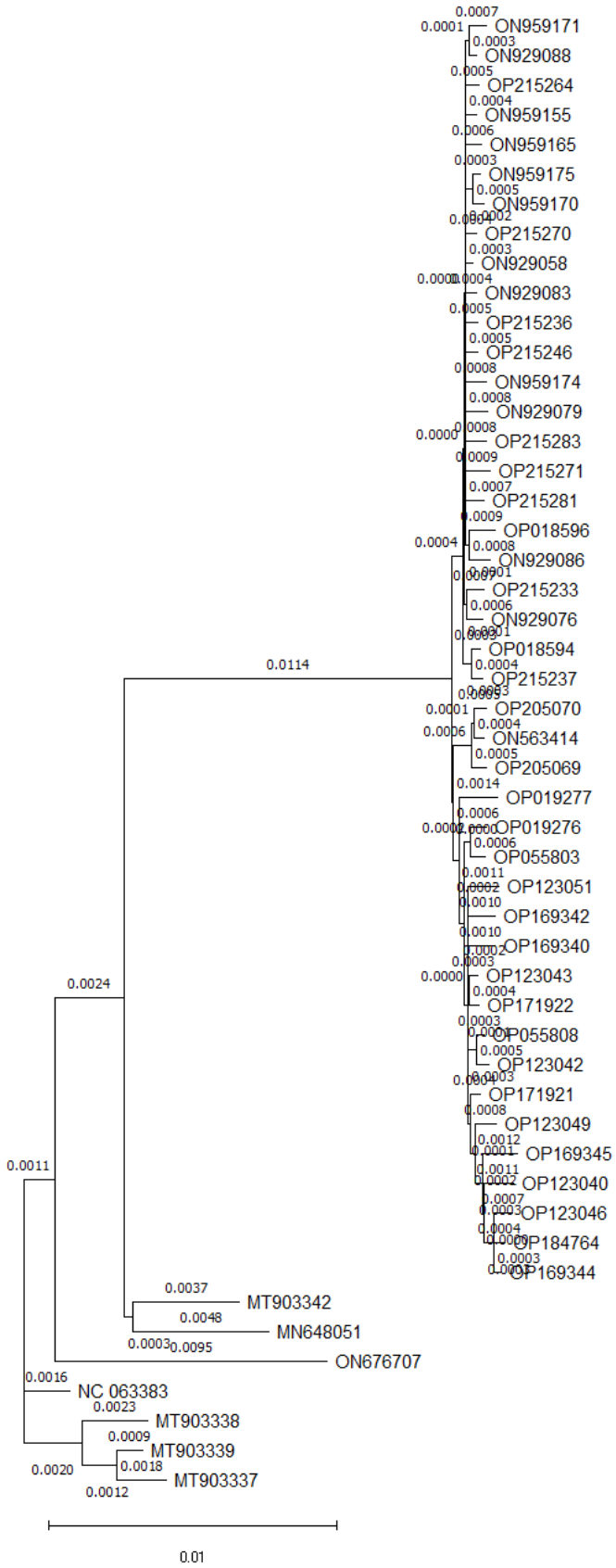


Figura 3.4: árbol con 50 secuencias del virus MPXV con branch lengths trás el postprocesamiento de los datos de la matriz de distancias NCD

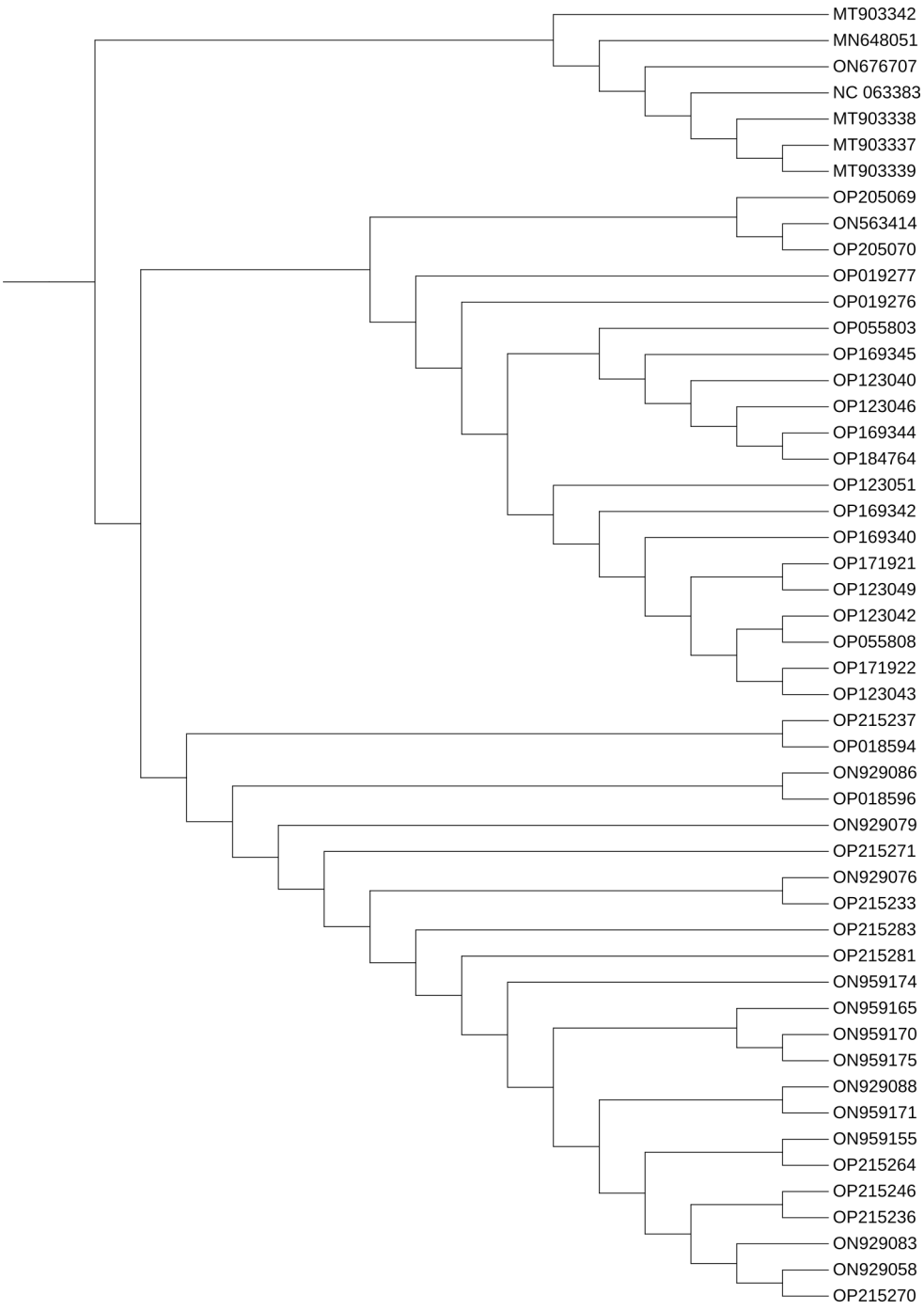


Figura 3.5: árbol con 50 secuencias del virus MPXV sin postprocesamiento salida de NCD

3.5. Sobre Augur y su comparación con NCD

Es interesante plantearse como han ido avanzando los proyectos por la vertiente del alineamiento y las ventajas/desventajas que tiene el método que se plantea frente a los proyectos que están a la orden del día. Augur es un proyecto open source para el análisis filogenético que surgió a finales de 2019. Este proyecto está formado por un conjunto de herramientas o subcomandos por ejemplo augur align, augur tree, augur export que proporcionan un multiple viral and bacterial pathogens analisis. Con este método se pudo lograr la creación de un árbol filogenético de 500 secuencias de covid mediante alineamiento en solamente cuestión de minutos mientras que con NCD obtuvimos un tiempo mayor a 10 horas. Este espectacular tiempo no es debido a augur en sí sino que es causado por las herramientas que utiliza en sus comandos, mafft en augur align y raXml en augur tree. Mafft es un programa destinado al alineamiento múltiple que inicialmente se basaba en la transformada de fourier pero que ya hoy en día ha implementado options for faster alignment of large numbers of sequences, higher accuracy alignments, alignment of non-coding RNA sequences, and the addition of new sequences to existing alignments. raxml ... Estos resultados que a la vista son mucho mejores que los que obtenemos con NCD se pueden mirar con

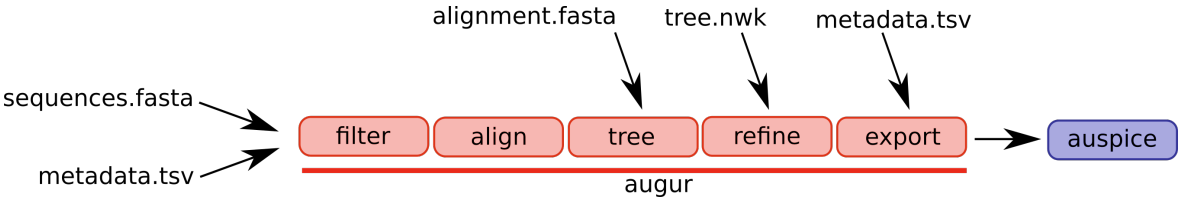


Figura 3.6: pipeline

3.6. Clasificación de variantes de interés

Capítulo 4

Compresión para otro tipo de secuencias

Aprovechando la generalidad del método NCD se plantea la búsqueda de dos datasets nuevos de secuencias que no sean de covid. En este caso los datasets que se van a investigar son secuencias de adn mitocondrial y de la viruela de mono.

4.0.1. ADN mitocondrial

Se obtuvieron 1524 secuencias de adn mitocondrial de genbank con la búsqueda de ("Homo sapiens"[Organism] OR homo sapiens[All Fields]) AND (mitochondrion[filter] AND ("16400"[SLEN] : "16600"[SLEN]) AND ("2022/07/23"[PDAT] : "2022/08/31"[PDAT])), son secuencias de alrededor de 16.500 bp. Dadas las limitaciones del software NCD se realizó una prueba con un subconjunto de 197 secuencias. Ya que el software de NCD eliminina secuencias que no son completas se realizó el análisis sobre 120 secuencias. Los resultados son bastante buenos, como en este caso no se contaban con metadatos ni división en clados se realizó una comparación de búsqueda de subárboles comunes con la herramienta iphyloc.

Tanto en estructura general como varios subárboles eran muy similares entre el árbol formado por NCD y el formado por augur. Los resultados de estas comparaciones se pueden observar en el repositorio...

4.0.2. Monkeypox o viruela de mono

La viruela del mono(MPXV) es una zoonosis viral (un virus transmitido a los humanos por los animales) cuyo primer reporte de infección en humanos apareció en los 1970s [3], y que ya en 2022 aparecieron múltiples reportes en países no endémicos. A dia de 24 se agosto ya hay registrados más de 44.000 casos en el mundo y más de 6000 en España.https://www.cdc.gov/poxvirus/monkeypox/response/2022/world-map.html

Nexstrain separa el virus en 2 datasets, el mpxv y el hmpxv1, este último que es el que se va a analizar comprende únicamente casos de transmisión humano-humano y corresponde un clado del mpxv como se puede ver en la imagen. Happi et al. Se recogieron 1262 secuencias de monkeypox de longitud 190.000-200.000bp proporcionadas por la misma página nextstrain. Se eligió como secuencia de referencia la NC-063383 y se ejecutó el algoritmo NCD para obtener un árbol de las 50 secuencias más próximas a la secuencia de referencia.

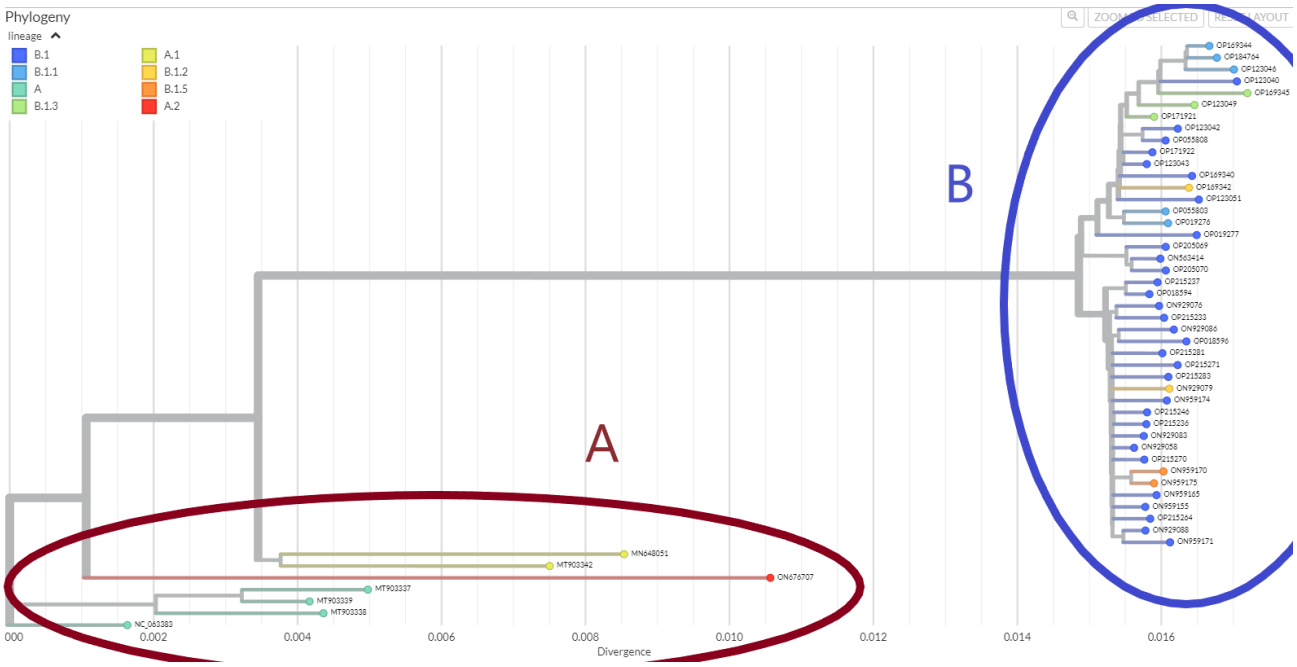


Figura 4.1: árbol salida del algoritmo NCD

Tomando como referencia la división en clados que ya he comentado, se pueden observar claramente la división en los 2 clusters, A y B, el clúster A incluye muestras de los clados A(entre la que se encuentra la secuencia de referencia NC-063383), A.1 y A.2. Con respecto al clúster márcado en azul se corresponde con el clado B y comprende muestras de los clados B.1, B.1.1, B.1.2, B.1.3 y B.1.5.

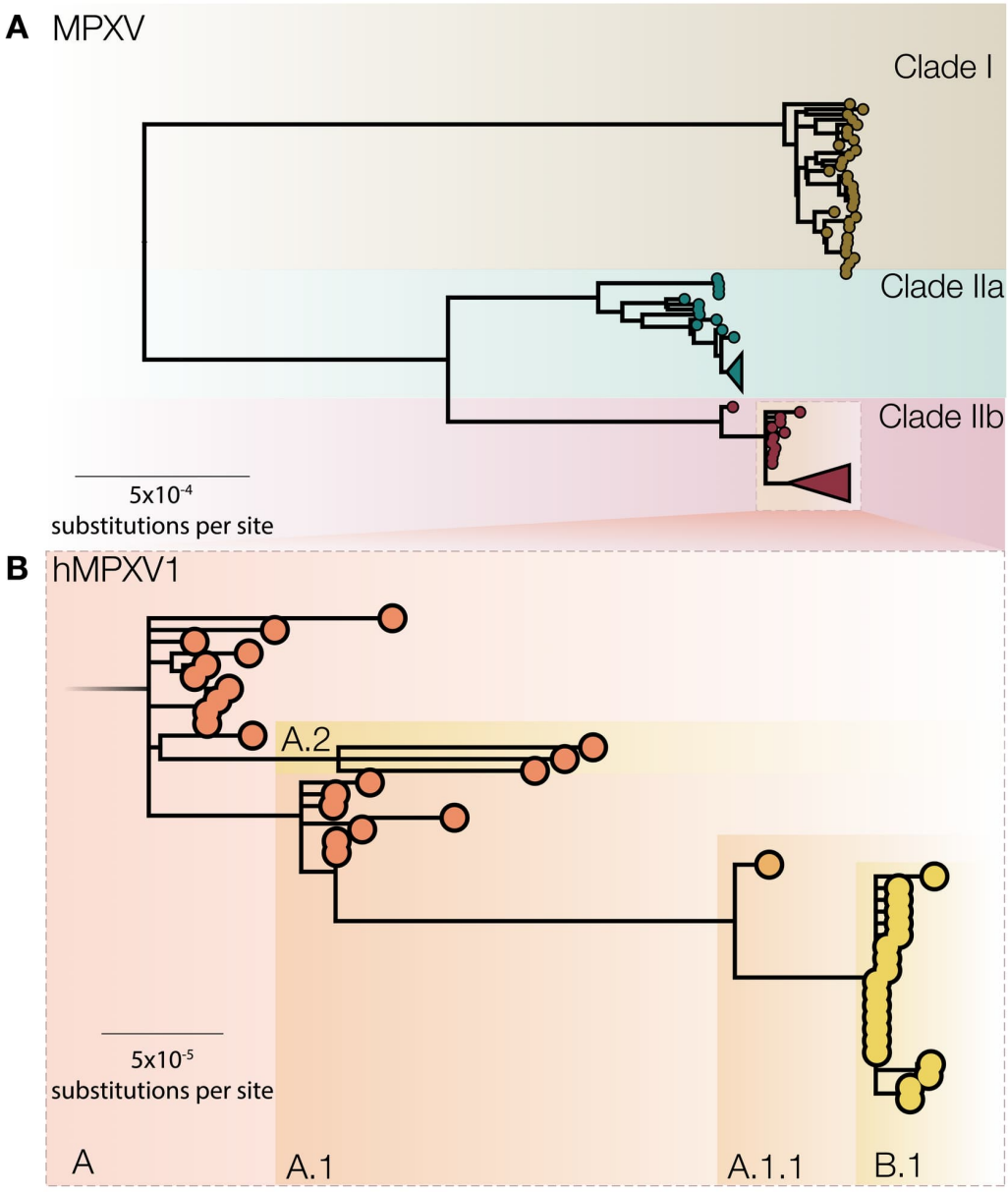


Figura 4.2: Esquema de división en clados del virus MPXV

Capítulo 5

Conclusiones

Algoritmo de caracter general que se uso para x,x,x,x y que probó su capacidad para crear filogenias suficientemente precisas como para sacar conclusiones con secuencias de covid pero que no puede hacer frente a nivel computacional, ya que la propia cualidad del método, la compresión, constituye su cuello de botella. mientras que los métodos de hoy en día, con el la reciente aparición del covid avanzaron muy rapidamente y mediante alineamiento múltiple logran unos bajos tiempos. También se logró ampliar el alcance del estudio original que probaba árboles con solamente 60 secuencias como máximo logrando árboles de hasta 500 secuencias sobre los que se realizó un análisis visual mediante la herramienta auspice.us.

Capítulo 6

Bibliografía

[1] H. Farnsworth. What-if machine analysis and design. *IEEE Transactions on quantum neuroscience electronics*, 3031.

[2] N. Sonntag. *Mis mejores recetas con repollo*. Anaconda, 2016.

[3] S. Z. Ramírez, K. Pérez. Self conscious robots in induction heating home appliances. *IEEE transactions on anthropomorphic robots*, 2018.

[4] Alumno Apellidos. Citar un tfg. Trabajo fin de grado, Universidad de Zaragoza, 2014.

[5] Alumno Apellidos. Citar un tfm. Trabajo fin de máster, Universidad de Zaragoza, 2014.

Lista de Figuras

Lista de Tablas

Anexos

Anexos A

Un anexo

Sed ut perspiciatis unde omnis iste natus error sit voluptatem accusantium doloremque laudantium, totam rem aperiam, eaque ipsa quae ab illo inventore veritatis et quasi architecto beatae vitae dicta sunt explicabo. Nemo enim ipsam voluptatem quia voluptas sit aspernatur aut odit aut fugit, sed quia consequuntur magni dolores eos qui ratione voluptatem sequi nesciunt. Neque porro quisquam est, qui dolorem ipsum quia dolor sit amet, consectetur, adipisci velit, sed quia non numquam eius modi tempora incidunt ut labore et dolore magnam aliquam quaerat voluptatem. Ut enim ad minima veniam, quis nostrum exercitationem ullam corporis suscipit laboriosam, nisi ut aliquid ex ea commodi consequatur? Quis autem vel eum iure reprehenderit qui in ea voluptate velit esse quam nihil molestiae consequatur, vel illum qui dolorem eum fugiat quo voluptas nulla pariatur? At vero eos et accusamus et iusto odio dignissimos ducimus qui blanditiis praesentium voluptatum deleniti atque corrupti quos dolores et quas molestias excepturi sint occaecati cupiditate non provident, similique sunt in culpa qui officia deserunt mollitia animi, id est laborum et dolorum fuga. Et harum quidem rerum facilis est et expedita distinctio. Nam libero tempore, cum soluta nobis est eligendi optio cumque nihil impedit quo minus id quod maxime placeat facere