



Universidad
Zaragoza

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



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./D^a. _____,

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

We gratefully acknowledge all data contributors, i.e., the Authors and their Originating laboratories responsible for obtaining the specimens, and their Submitting laboratories for generating the genetic sequence and metadata and sharing via the GISAID Initiative, on which this research is based.

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

1. Introducción y objetivos	IX
1.1. Filogenética	IX
1.2. Compresión para cálculo de filogenias	X
1.3. Sobre el COVID-19 y sus fuentes de datos	X
2. Despliegue y replicación del sistema	XIII
2.1. TO DO	XIII
3. Comparación de los resultados obtenidos con el estado del arte	XV
3.0.1. Criterios de comparación	XV
3.1. Datos obtenidos de nextstrain	XVII
3.1.1. Método 2	XVII
3.2. Datos obtenidos de GISAID	XVII
3.3. Escalabilidad y estudio del sistema	XVIII
3.4. Optimización del sistema	XX
3.4.1. Uso de las distancias de compresión en árboles filogenéticos . . .	XX
3.5. Sobre Augur y su comparación con NCD	XXIV
3.6. Clasificación de variantes de interés	XXIV
4. Compresión para otro tipo de secuencias	XXV
4.0.1. ADN mitocondrial	XXV
4.0.2. Monkeypox o viruela de mono	XXV
5. Conclusiones	XXIX
6. Bibliografía	XXXI
Lista de Figuras	XXXIII
Lista de Tablas	XXXV
Anexos	XXXVI

Capítulo 1

Introducción y objetivos

1.1. Filogenética

La filogenética se encarga de establecer una relación entre organismos mediante un árbol o cladograma dicotómico que representa una hipótesis evolutiva. Se divide en varias ramas: la filogenética morfológica y la filogenética molecular. La filogenética morfológica establece relaciones entre seres vivos en base a similitudes morfológicas o anatómicas. La filogenética molecular, base de la bioinformática, investiga las relaciones mediante el análisis de secuencias de ADN, ARN o proteínas y gracias a los algoritmos computacionales logra obtener estos árboles filogenéticos.

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 aminoácidos 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 detección de diferencias entre dos secuencias. También aparece la adición/borrado de gaps(denotado por " – ") en las secuencias para que coincida con más términos y así 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 métodos: los basados en secuencias y los basados en distancias. 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 estos están máxima verosimilitud y máxima parsimonia.

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

1.2. Compresión para cálculo de filogenias

La idea que subyace en los métodos de compresión es librarse de los alineamientos y los inconvenientes que estos acarrearán 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 .

De esta forma el coste de la creación de la matriz depende de la eficiencia del compresor.

Tanto en el artículo original de Vitanyi[1] 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.

Aquí 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.

1.3. Sobre el COVID-19 y sus fuentes de datos

El coronavirus SARS-CoV-2, descubierto en enero de 2020 tras aislarse de muestras de pacientes afectados por una nueva enfermedad ahora conocida como COVID-19, evoluciona y sufre cambios genéticos, como todos los virus. Conocer estos cambios, que explican su comportamiento, es fundamental para mejorar el manejo del virus y el abordaje de la enfermedad. Desde el hallazgo del SARS-CoV-2 hasta ahora, la secuenciación de su genoma y el conocimiento de las diferentes variantes que circulan por el mundo está permitiendo conocer más sobre su origen, influencia y distribución.

Gracias a un esfuerzo sin precedentes han ido apareciendo numerosas herramientas surjan para realizar el seguimiento de este virus. Nextstrain[2] muestra prácticamente a tiempo real la epidemiología genómica del virus y como ha ido transmitiéndose a lo largo del tiempo por los diferentes países afectados.

Actualmente, Nextstrain [2] define numerosos grandes clados filogenéticos para clasificar los genomas que se van secuenciando y que se nombran en función del año estimado en el que emergieron seguido de una letra, estos agrupan las diferentes mutaciones que va sufriendo el virus y se detallarán posteriormente.

Por su parte, GISAID[3], actúa como base de datos y pone a disposición secuencias genéticas y datos clínicos y epidemiológicos para ayudar a los investigadores a comprender cómo evolucionan y se propagan los virus durante epidemias y pandemias. Actualmente, cuentan con 12,963,236 genomas que comprenden desde 2019-12-24 hasta 2022-08-31.

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. TO DO

TO DO

Capítulo 3

Comparación de los resultados obtenidos con el estado del arte

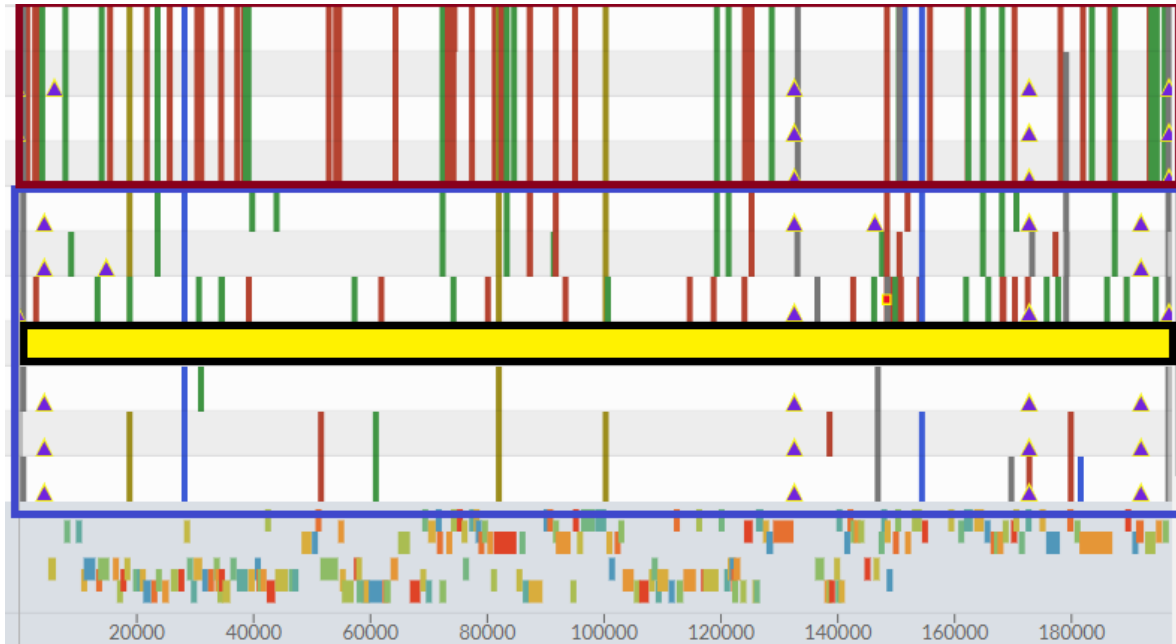
3.0.1. Criterios de comparación

Para la comparación de los árboles filogenéticos que se irán obteniendo a lo 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 diferentes 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 [acabar]

- 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(Wuhan-Hu-1) con los sistemas actuales utilizamos 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 máxima 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.

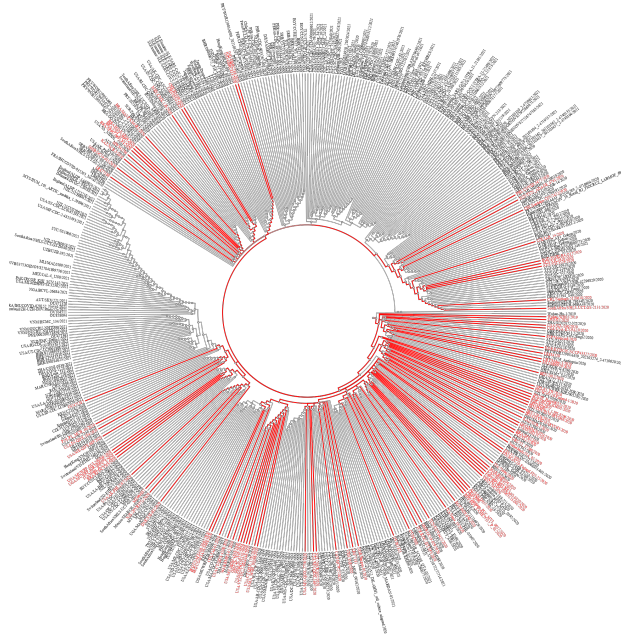
3.2. Datos obtenidos de GISAID

En este caso obtenemos los datos de nexstrain.org pero estos pertenecen a GISAID. Son datos pertenecientes a Europa. Para esta prueba se elegirán 50 secuencias linealmente separadas, es decir, no se considerarán las n secuencias más próximas a la de referencia sino que se elegirán uniformemente entre las secuencias, con el objetivo de poner en contexto las magnitudes 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

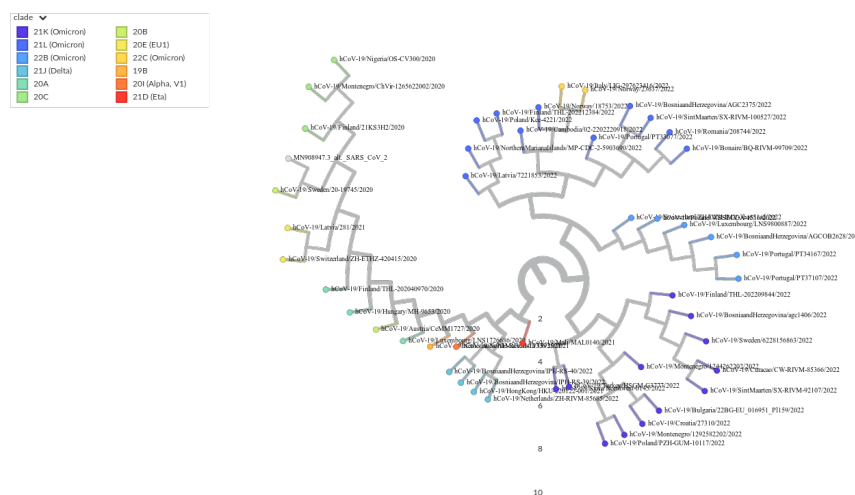


Figura 3.3: Árbol salda

de sus necesarios precursores, el alineamiento múltiple de secuencias.

Las dos cuestiones que preocupan al reconstruir árboles filogenéticos a partir de grandes matrices de datos son el tiempo de cálculo y la fiabilidad. La alineación múltiple de secuencias, el precursor necesario para la construcción del árbol, y la inferencia filogenética son problemas computacionales que consumen mucho tiempo. El tiempo de ejecución, t , de un algoritmo de construcción de árboles para una matriz de datos arbitraria depende principalmente del número de especies, N , porque $t = f(N)$. La relación funcional, f , oscila entre exponencial para la mayoría de los métodos de construcción de árboles que se basan en la optimización, como la parsimonia y la máxima verosimilitud hasta polinómica para soluciones aproximadas ("heurísticas") a estos mismos o para ciertos métodos basados en la distancia, como el como neighbor-joining.

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(Wuhan-Hu-1). El coste de este paso es $t(\text{paso1}) = n * t(\text{NCD})$ lo que

en términos de $O(n)$ 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 caracteres tarda 0,3 segundos.
- El tamaño de la matriz de una forma exponencial, es decir, se realizarán $n \cdot n$ operaciones de cálculo de la NCD (en caso de que se aplique la optimización que se explica posteriormente se realizarían $\frac{n \cdot n}{2}$)

La fórmula con la que se realizan las estimaciones del tiempo es: $t(matriz) = t(NCD) \cdot n$ y en términos de O grande establece un coste $O(n^2)$.

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 $n \times n$ 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 $id1+id2z$ 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 artículo 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 fácilmente.

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>

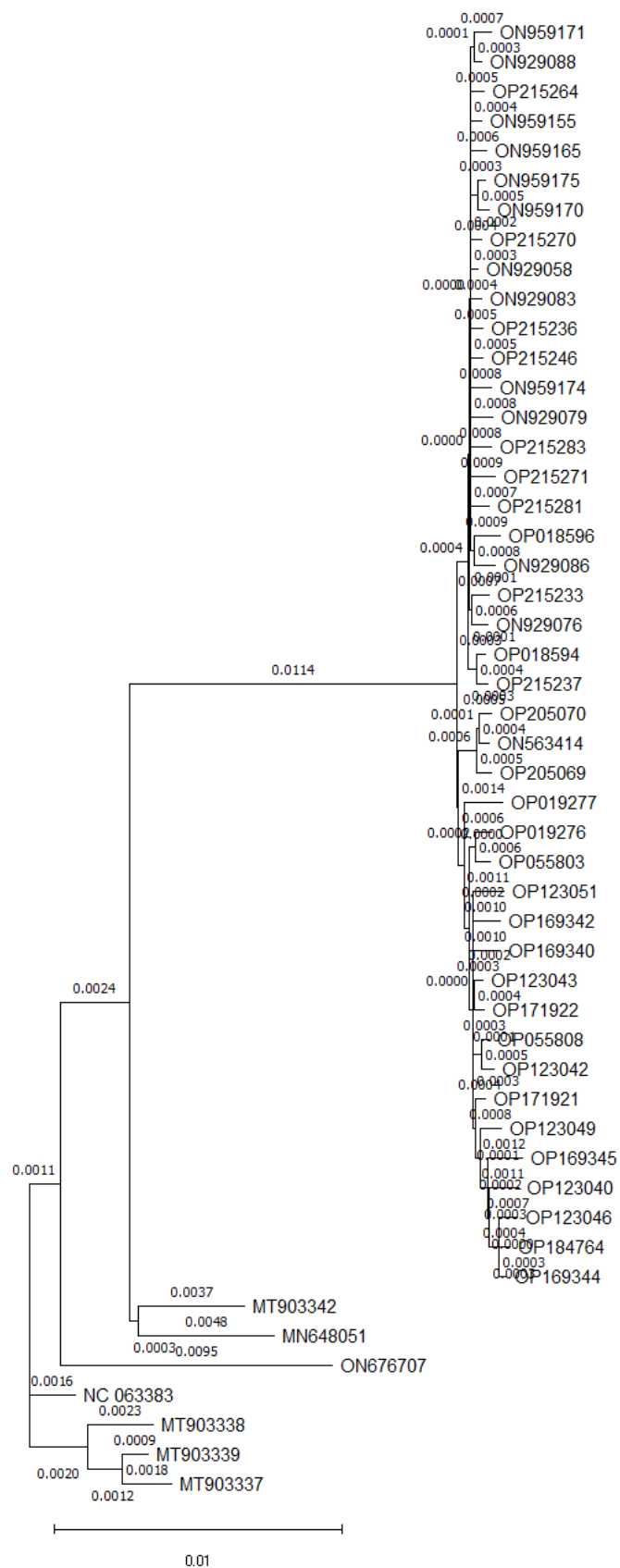


Figura 3.4: árbol con 50 secuencias del virus MPXV con branch lengths tras el postprocesamiento de los datos de la matriz de distancias NCD

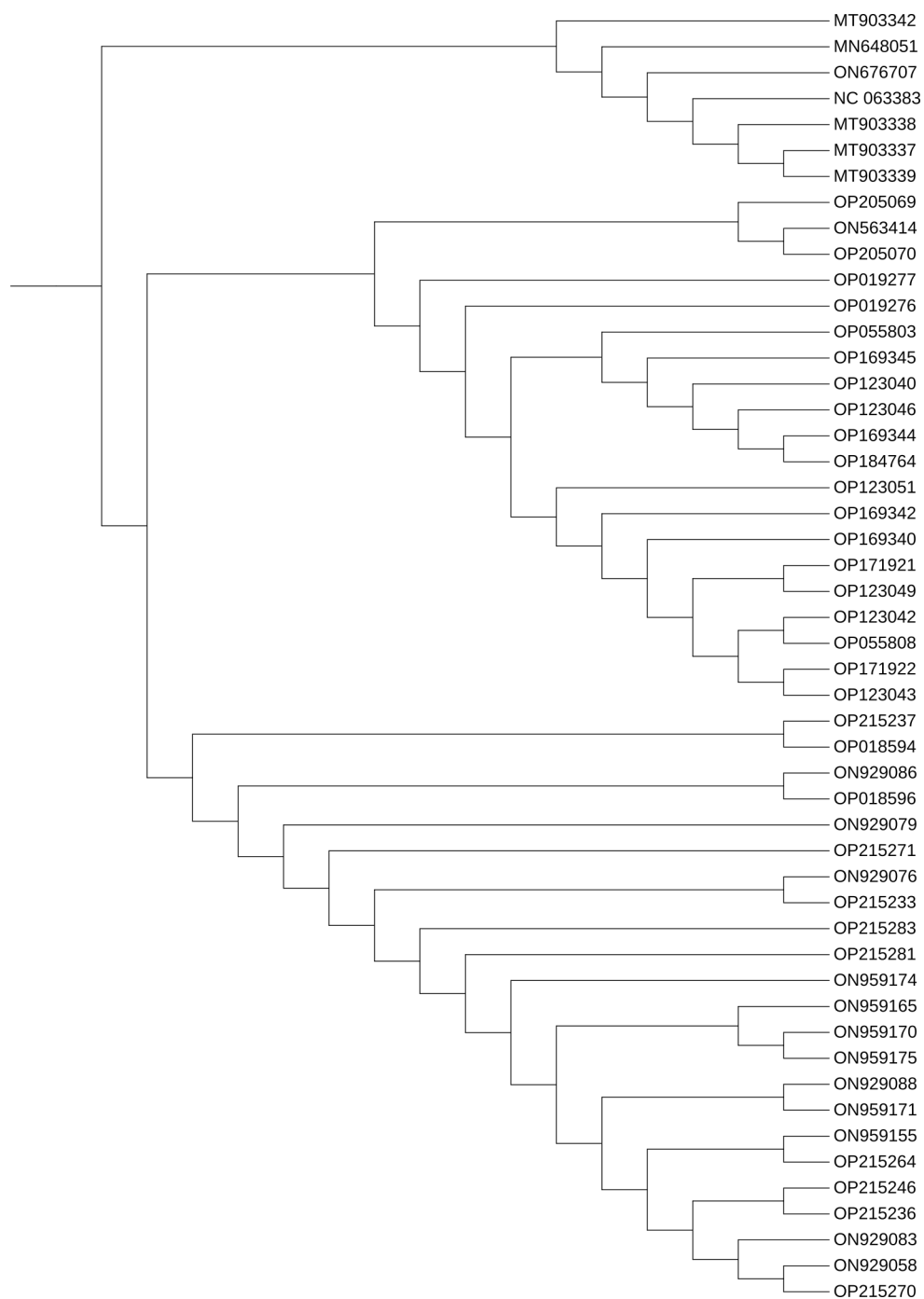


Figura 3.5: árbol con 50 secuencias del virus MPXV sin postprocesamiento salida de NCD

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 analysis. 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

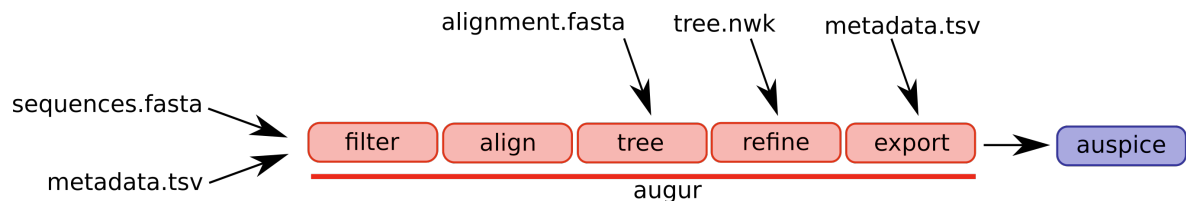


Figura 3.6: pipeline

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 elimina 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 día de 24 de 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 mpvx 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 mpvx 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.

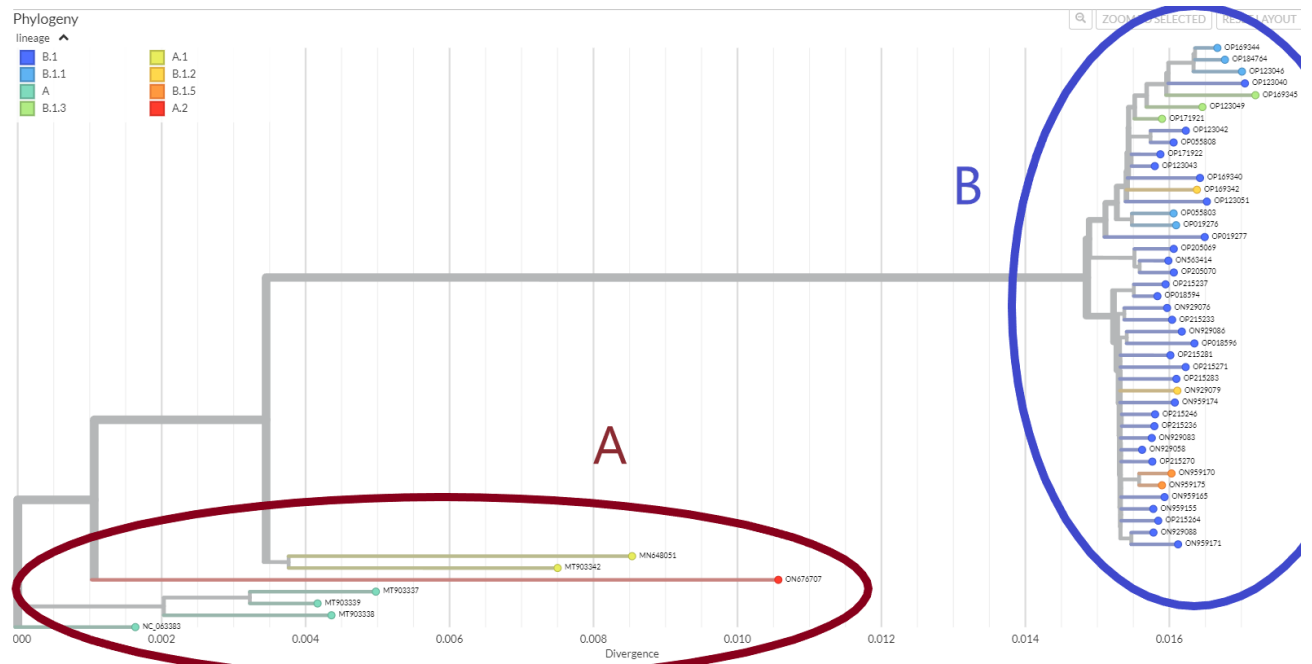


Figura 4.1: árbol salida del algoritmo NCD

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 marcado 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.

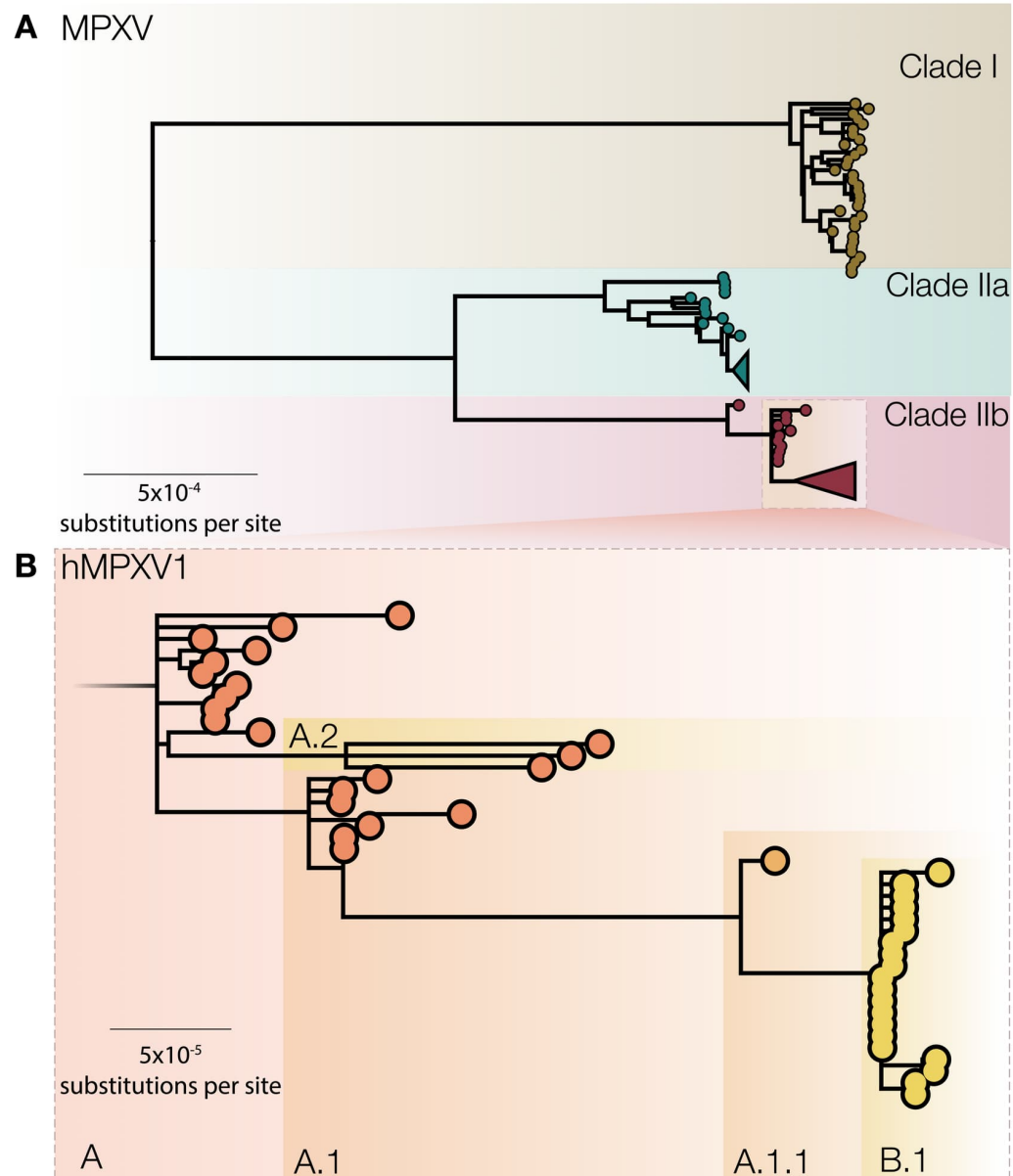


Figura 4.2: Esquema de división en clados del virus MPXV

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] Rudi L. Cilibrasi and Paul M.B. Vitányi. Fast whole-genome phylogeny of the covid-19 virus sars-cov-2 by compression. *bioRxiv*, 2020.
- [2] James Hadfield, Colin Megill, Sidney M Bell, John Huddleston, Barney Potter, Charlton Callender, Pavel Sagulenko, Trevor Bedford, and Richard A Neher. Nextstrain: real-time tracking of pathogen evolution. *Bioinformatics*, 34(23):4121–4123, 05 2018.
- [3] Stefan Elbe and Gemma Buckland-Merrett. Data, disease and diplomacy: Gisaïd’s innovative contribution to global health. *Global Challenges*, 1(1):33–46, 2017.
- [4] H. Farnsworth. What-if machine analysis and design. *IEEE Transactions on quantum neuroscience electronics*, 3031.
- [5] N. Sonntag. *Mis mejores recetas con repollo*. Anaconda, 2016.
- [6] S. Z. Ramírez, K. Pérez. Self conscious robots in induction heating home appliances. *IEEE transactions on anthropomorphic robots*, 2018.
- [7] Alumno Apellidos. Citar un tfg. Trabajo fin de grado, Universidad de Zaragoza, 2014.
- [8] Alumno Apellidos. Citar un tfm. Trabajo fin de máster, Universidad de Zaragoza, 2014.

Lista de Figuras

3.1. Captura del análisis realizado por nextclade.org	XVI
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	XVIII
3.3. Árbol salida	XIX
3.4. árbol con 50 secuencias del virus MPXV con branch lengths tras el postprocesamiento de los datos de la matriz de distancias NCD	XXII
3.5. árbol con 50 secuencias del virus MPXV sin postprocesamiento salida de NCD	XXIII
3.6. pipeline	XXIV
4.1. árbol salida del algoritmo NCD	XXVI
4.2. Esquema de división en clados del virus MPXV	XXVII

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