Abordagem algébrica para seleção de clones ótimos em projetos genomas e metagenomas

Mauricio Egídio Cantão

PROGRAMA INTERUNIDADES EM BIOINFORMÁTICA
DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: BIOINFORMÁTICA

ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. Eliana G. M. Lemos

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. João Eduardo Ferreira

São Paulo, 1 de Dezembro de 2009

Dedico este trabalho aos meus pais, Nilse e Valdir, a meus irmãos, Adriano e Luciano, e à minha noiva Nátalie, pelo amor, carinho, confiança e aos esforços dispensados para a minha formação.

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me dado a oportunidade de estar no mundo.

Aos meus pais, Valdir Egídio Cantão e Nilse de Jesus Perseguin Cantão, e à minha família, agradeço todo o amor, carinho, compreensão e respeito.

Agradeço a meus orientadores Prof^ª. Dr^ª. Eliana Gertrude de Macedo Lemos e Prof. Dr. João Eduardo Ferreira que, além de me orientar cientificamente, me deram ensinamentos que foram úteis no meu crescimento pessoal e profissional. A vocês serei eternamente grato.

Aos meus amigos do Laboratório (LBMP) em especial ao Rodrigo Matheus Pereira e Luciano Takeshi Kishi, pela ajuda que me deram durante todo o doutorado, principalmente pela disposição em me explicar incansavelmente às dúvidas biológicas que surgiram durante o desenvolvimento da tese. Sem esquecer que muitas dessas discussões ocorreram na escada do laboratório, comendo pizza ou lanche durante o turno noturno. Aos amigos Douglas Paixão, Érico Silveira e ao Tehuni González que ficavam durante o terceiro turno no Laboratório.

Agradeço também ao pessoal do Laboratório de Banco de Dados do IME-USP, em especial ao Luciano Araújo, que considero uma pessoa extraordinária como pessoa, profissional e amigo.

Aos companheiros de república Maurílio Garcia, André Pádua Durante, Eric Motoiama, pela amizade e convivência.

Enfim, a todos aqueles que de forma direta ou indireta colaboraram para a realização deste trabalho.

Muito obrigado!

Resumo

Devido à grande diversidade de microrganismos desconhecidos no meio ambiente, 99% deles não podem ser cultivados nos meios de cultura tradicionais dos laboratórios. Para isso, projetos metagenômicos são propostos para estudar comunidades microbianas presentes no meio ambiente, a partir de técnicas moleculares, em especial o seqüenciamento. Dessa forma, para os próximos anos é esperado um acúmulo de seqüências produzidas por esses projetos. As seqüências produzidas pelos projetos genomas e metagenomas apresentam vários desafios para o tratamento, armazenamento e análise, como exemplo: a busca de clones contendo genes de interesse.

Este trabalho apresenta uma abordagem algébrica que define e gerencia de forma dinâmica as regras para a seleção de clones em bibliotecas genômicas e metagenômicas, que se baseiam em álgebra de processos. Além disso, uma interface web foi desenvolvida para permitir que os pesquisadores criem e executem facilmente suas próprias regras de seleção de clones em bancos de dados de seqüências genômicas e metagenômicas. Este software foi testado em bibliotecas genômicas e metagenômicas e foi capaz de selecionar clones contendo genes de interesse.

Abstract

Due to the wide diversity of unknown organisms in the environment, 99% of them cannot be grown in traditional culture medium in laboratories. Therefore, metagenomics projects are proposed to study microbial communities present in the environment, from molecular techniques, especially the sequencing. Thereby, for the coming years it is expected an accumulation of sequences produced by these projects. Thus, the sequences produced by genomics and metagenomics projects present several challenges for the treatment, storing and analysis such as: the search for clones containing genes of interest.

This work presents an algebraic approach that defines it dynamically and manages the rules of the selection of clones in genomic and metagenomic libraries, which are based on process algebra. Furthermore, a web interface was developed to allow researchers to easily create and execute their own rules to select clones in genomic and metagenomic sequence database. This software was tested in genomics and metagenomics libraries and it was able to select clones containing genes of interest.

Índice

Capítulo 1.....	1
Introdução	1
1.2 Objetivos	4
1.4 Justificativas biológicas	6
1.5 Justificativas computacionais	6
1.6 Contribuições.....	8
1.6.1 Publicações.....	9
1.7 Organização do texto	12
Capítulo 2.....	13
Fundamentos	13
2.1 Fundamentos biológicos	13
2.1.1 Sequenciamento de genoma	15
2.1.2 Método de Sanger	16
2.1.3 Sequenciamento de genoma pela técnica de <i>shotgun</i>	17
2.1.4 Pirosequenciamento	19
2.1.5 Plataforma de sequenciamento Solid e Solexa	20
2.1.6 Técnica de microarranjo de DNA	21
2.1.7 Técnica de CGH.....	23
2.1.8 Tipos de microarranjo	23
2.2 Fundamentos computacionais	25
2.2.1 <i>Workflow</i>	25
2.2.2 Padrões básicos de controle de fluxo	26
2.2.3 Álgebra de processos.....	28
2.2.4 NPDL – Linguagem para definição de plano de navegação	29
Capítulo 3.....	32
Trabalhos relacionados	32
3.1 Microarranjos compostos por clones de <i>shotgun</i>	33
3.2 Análises em metagenomas	34
3.3 Ferramentas de bioinformática	34
3.4 Workflow científico.....	35
Capítulo 4.....	37
Materiais e métodos.....	37
4.1 Regras de seleção de clones	38
4.1.1 Clones em genomas parciais.....	39
4.1.1.1 Clones localizados nos mesmos <i>contigs</i> , ou <i>contigs</i> separados.....	40
4.1.1.2 Clones localizados nas sequências dos <i>contigs</i> e <i>singlets</i>	42
4.1.1.3 Clones localizados como <i>singlets</i>	43
4.1.2 Clones em genomas completos e metagenômicos.....	43
Capítulo 5.....	45
Implementação das ferramentas.....	45
5.1 Gerenciamento do fluxo do sistema via código de programação.....	45
5.2 Gerenciamento do fluxo do sistema por linguagem algébrica	46
5.3 Definição das regras e ações que compõem o processo de seleção dos clones no OCI 2	49
5.3.1 Interpretação das regras e mapeamento em álgebra de processos	50
5.4 Modelagem do banco de dados do OCI 2	58

5.5 Interface do OCI 2	61
5.6 Cadastro dos dados no sistema.....	65
5.6.1 Formatação dos arquivos em genomas completos.....	65
5.6.2 Formatação dos arquivos em genomas parciais.....	68
5.6.3 Página de cadastros e listagem dos dados	70
5.7 Análise de desempenho do OC Identifier x OCI 2.....	73
5.7.1 Desempenho entre as versões OCI 1 e OCI 2	74
5.7.2 Desempenho do OCI 2	75
Capítulo 6.....	77
Resultados obtidos e conclusões	77
6.1 Resultados da seleção de clones ótimos com OC Identifier tool	77
6.2 Resultados da seleção de clones pelo OCI 2 aplicado na segunda montagem parcial do B. elkanii	79
6.3 Resultados da seleção de clones pelo OCI 2 aplicado no genoma completo de X. citri	81
6.4 Resultados da seleção de clones pelo OCI 2 aplicado em projeto metagenômico.....	83
6.5 Conclusão	85
6.6 Trabalhos futuros.....	86
Referências Bibliográficas.....	87

Índice de Figuras

Figura 1.1 – Representação da molécula de DNA	14
Figura 1.2 – Representação da molécula de RNA.....	14
Figura 2 – Processo de transcrição do DNA em RNAm para a síntese de proteína.....	15
Figura 3.1 – Amplificação dos fragmentos de DNA interrompidos por um ddNTP.....	17
Figura 3.2 – Eletroferograma onde cada pico representa uma base lida do DNA.....	17
Figura 4 – No seqüenciamento de organismos com genomas menores de 3Mb e/ou baixo número de <i>gaps</i> e/ou alto número de regiões repetitivas, foi feita a cobertura do genoma 8 vezes pela técnica de Sanger para alcançar a abordagem de melhor custo-benefício. Aos organismos maiores de 3 Mb, e/ou muitos <i>gaps</i> nas seqüências, e/ou muitas regiões com paradas bruscas durante o seqüenciamento, foi usado um seqüenciamento inicial cobrindo 5 vezes o genoma pela técnica de Sanger, seguidos de 2 corridas usando o piroseqüenciamento para alcançar a abordagem de melhor custo-benefício.....	20
Figura 5 – Esquema ilustrativo dos procedimentos da técnica de microarranjo de DNA	22
Figura 6.1 – Seqüência	26
Figura 6.2 – Divisão paralela	27
Figura 6.3 – Sincronização	27
Figura 6.4 – Escolha exclusiva.....	27
Figura 6.5 – Junção simples	28
Figura 7.1 – Esquema das posições das ORFs e dos clones dentro dos <i>contigs</i> . No “Contig 1” e “Contig 2”, são duas ORFs inicialmente identificadas. Mesmo com um <i>gap</i> entre os dois <i>contigs</i> , identificou-se que a “ORF 2” do “Contig 2” é a mesma e continuação da “ORF 2” do “Contig 1”. O clone ótimo que seleciona a “ORF 2” é o clone “D”, enquanto que o clone ótimo que seleciona a “ORF 1” é o Clone “A”.....	40
Figura 7.2 – O clone B representa a “ORF 8”, sendo considerado como ótimo por conter apenas 1 ORF. Nesse exemplo, a seqüência amplificada pelo óligo <i>forward</i> do clone está localizada internamente ao “Contig 19”, enquanto que a seqüência reversa (B’) aparece como <i>Singlet</i>	42
Figura 7.3 – As seqüências desse clone estão identificadas como <i>singlets</i> , pois estão fora dos <i>contigs</i> e possuem a mesma ORF identificada nas duas seqüências	43
Figura 7.4 – Clones dispostos na seqüência final do genoma cromossomal.....	43
Figura 8 – Representa um genoma completo e contém as seqüências das ORFs de 1 a 3, os clones são identificados pelas letras A a H, e as seqüências dos cosmídeos identificadas pela letra C, seguida de um número, por exemplo C1, C2. Os clones e cosmídeos são formados pelas	

seqüências <i>forward</i> e <i>reverse</i> , sendo que a seqüência <i>reverse</i> é identificada por aspas simples após seus nomes, exemplo, <i>A'</i> , <i>D'</i> , <i>C3'</i> . Nem sempre as duas seqüências do clone estão presentes na montagem, como é o caso dos clones <i>B</i> , <i>H</i> e <i>I</i>	52
Figura 9 – Representa um fragmento de um genoma com duas ORFs, uma seqüência de “rRNA 5S” e 8 clones identificados pelas letras “A” a “H”. O clone “B” encontra-se interno à “ORF 4”, enquanto que o clone “F” está localizado externamente à “ORF 5”. O clone “E” representa a “ORF 5” e contém 7 bases da seqüência do “rRNA 5S” na seqüência no sentido <i>forward</i>	54
Figura 10 – Representa um fragmento de um genoma com 2 ORFs, na região promotora da “ORF 12” e 6 clones identificados pelas letras A a F. O clone A cobre a “ORF 11” em 450 bases, enquanto que o clone B cobre a mesma ORF com 800 bases. O clone D representa a “ORF 12” por completo e inicia a 19 bases antes de sua região promotora, enquanto que o clone E representa a “ORF 12”, cobrindo 900 bases da mesma.....	57
Figura 11 – Modelo conceitual/lógico do banco de dados da ferramenta <i>OCI 2</i> para genomas completos, parciais e metagenômicos	59
Figura 12 – Modelo físico do banco de dados da ferramenta <i>OCI 2</i> para genomas completos, parciais e metagenômicos.....	61
Figura 13 – Interface da ferramenta para projeto de genoma completo de procarioto. Nessa interface, o usuário seleciona quais as atividades que farão parte da regra e define seus valores. Definida as regras, a ferramenta gera a expressão algébrica que representa fielmente o processo de seleção.....	61
Figura 14 – Página responsável pela execução, cancelamento, edição e exclusão das regras elaboradas	62
Figura 15 – Interface da ferramenta no projeto de genoma parcial. Essa interface apresenta a adição da nova informação ‘ <i>Clone Localization</i> ’ ao processo de seleção de clones.....	63
Figura 16 – Visualização do número de clones selecionados por cada regra e os clones selecionados após a finalização do processo	64
Figura 17 – Após a execução dos processos, é possível visualizar, cancelar ou fazer <i>download</i> dos resultados.....	65
Figura 18.1 – Exemplo do arquivo de cadastro das ORFs no formato <i>protein table</i> . Cada campo no arquivo é separado pelo delimitador <i>tab</i>	66
Figura 18.2 – Exemplo do arquivo de cadastro dos clones que compõem o genoma	66
Figura 18.3 – Exemplo do arquivo de cadastro das regiões promotoras ou ITS	67
Figura 18.4 – Exemplo do arquivo de cadastro das categorias funcionais.....	67
Figura 18.5 – Exemplo de arquivo de cadastro das categorias funcionais para cada ORF no genoma.	68
Figura 19.1 – Exemplo do arquivo de cadastro das ORFs presentes no genoma.....	68
Figura 19.2 – Exemplo do arquivo de cadastro das ORFs nas seqüências dos <i>contigs</i>	69

Figura 19.3 – Exemplo do arquivo de cadastro das ORFs nas seqüências dos clones	69
Figura 19.4 – Exemplo do arquivo de cadastro dos clones que compõem o genoma	70
Figura 19.5 – Exemplo do arquivo de cadastro da região promotora ou ITS nas seqüências do genoma	70
Figura 20 – Página de cadastro dos tipos de seqüências genômicas	71
Figura 21 – Página que realiza o <i>upload</i> dos arquivos para cadastramento dos dados primários e secundários ao sistema	72
Figura 22 – Lista das seqüências cadastradas no sistema.....	73
Figura 23 – Tempo de processamento em relação ao número de clones presentes na consulta.....	74
Figura 24 – Evolução no tempo de processamento de seleção dos clones no genoma completo <i>de X. citri</i>	76

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Número de clones selecionados após a execução do processo <i>Select_CC_S</i>	79
Tabela 2 – Número de clones selecionados após a execução do processo <i>Select_CC_D</i>	80
Tabela 3 – Número de clones selecionados após a execução do processo <i>Select_CS</i>	80
Tabela 4 – Número de clones selecionados após a execução do processo <i>Select_SS</i>	80
Tabela 5 – Número de clones selecionados após a execução de cada regra no genoma completo da <i>X. citri</i>	82
Tabela 6 – Códigos de identificação e funções das ORFs identificadas e anotadas do Cosmídeo B7P37	84
Tabela 7 – Número de clones selecionados após a execução de cada regra do processo <i>Select_ORF_3</i> no projeto de metagenoma	84

Siglas

ACP	<i>Algebra of Communicating Processes</i>
AOT	<i>AnalysisOverlapTarget</i>
BAC	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>
CCS	<i>Calculus of Communicating Systems</i>
CGH	<i>Comparative Genomic Hybridization</i>
COG	<i>Clusters of Orthologous Groups</i>
CSP	<i>Communicating Sequential Processes</i>
CT	<i>CoverageTarget</i>
DCT	<i>DistanceCloneTarget</i>
DDR	<i>Double Data Rate</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> ou <i>Ácido Desoxirribonucleico</i>
DNAc	<i>Ácido Desoxirribonucleico complementar</i>
ddNTP	<i>Didesoxinucleotideo</i>
dNTP	<i>Desoxirribonucleotideo</i>
DOC	<i>DisplayOptimalClones</i>
DOW	<i>Download</i>
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
GB	<i>GigaByte</i>
GHz	<i>Giga Hertz</i>
GO	<i>Go on</i>
HD	<i>Hard Disk</i>
PRI	<i>Print</i>
Kbp	<i>Kilo base pairs</i>
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
LBMP	<i>Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas</i>
LCC	<i>LocalizacaoCloneContig</i>
MAPA	<i>Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento</i>
MHz	<i>Mega Hertz</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>

NOS	<i>NumOrfSeq</i>
NPDL	<i>Navigation Plan Definition Language</i>
OC	<i>Optimal Clone</i>
OCI	<i>Optimal Clone Identifier</i>
OH	Hidroxila
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCT	<i>PositionCloneTarget</i>
PO	<i>PosicaoOrf</i>
PPi	Pirofosfato
PR	<i>PromoterRegion</i>
PTT	<i>Protein Table</i>
RAM	<i>Random Access Memory</i>
RDM	<i>Rhizobia Defined Medium</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> ou Ácido Ribonucléico
RNA _m	Ácido Ribonucléico mensageiro
RNA _t	Ácido Ribonucléico transportador
RNA _r	Ácido Ribonucléico ribossomal
RPM	Rotação Por Minuto
SATA	<i>Serial Advanced Technology Attachment</i>
SABIA	<i>System for Automated Bacterial Integrated Annotation</i>
SCBI	<i>SelectClonesById</i>
SCBT	<i>SelectClonesByTarget</i>
SO	<i>SeqOrf</i>
SQL	<i>Structured Query Language</i>
TSV	<i>Tab Separated Values</i>
TY	<i>Tryptone-Yeast</i>
WfMC	<i>Workflow Management Coalition</i>
WFMS	<i>Workflow Management System</i>
YAC	<i>Yeast Artificial Chromosome</i>

Capítulo 1

Introdução

Nas seqüências de DNA dos organismos, algumas regiões contêm informações para a síntese de proteínas. Nessas regiões, as seqüências de DNA, que são transcritas em RNAm (RNA mensageiro) e sintetizadas em proteínas, são chamadas de genes (Voet, Voet e Pratt, 2000). Identificar os genes que compõem o organismo e saber quando estão sendo expressos (transcritos em RNAm) é fundamental para a compreensão dos mecanismos envolvidos nos processos celulares em escala molecular.

Uma forma experimental de análise do perfil de expressão gênica em organismos é a técnica de microarranjos de DNA. Essa técnica consiste de análise em larga escala do nível de expressão gênica, usando como base o princípio da hibridização (processo de junção das fitas complementares do DNA). Além de análises de expressão gênica, essa técnica vem sendo utilizada na comparação de dois ou mais genomas por meio da hibridização, conhecido como CGH (do inglês *Comparative Genomic Hybridization*), como também na identificação de polimorfismos que podem ser úteis nos diagnósticos e prognósticos de doenças genéticas (Pinkel e Albertson, 2005).

Para o uso eficiente da tecnologia de microarranjos de DNA é importante a presença de seqüências de genes conhecidos na lâmina. Uma maneira de obter essas seqüências gênicas é por meio de genomas completamente seqüenciados. Com o genoma seqüenciado e anotado são sintetizados óligos, ou sondas de DNA, específicos para comporem microarranjos (Hauser et al., 2006). Porém, a síntese de milhares de sondas para representar os genes do genoma tem custo elevado, pois o desenho dos óligos e suas sínteses consomem tempo e recursos humanos. Além disso, periodicamente os oligonucleotídeos utilizados nos experimentos necessitam ser sintetizados.

Uma alternativa às sínteses individuais de óligos para compor um microarranjo são os *chips* de DNA. Os *chips* são lâminas que contêm sondas dos genes do genoma pré-definidas e vendidas por empresas específicas. Porém, o uso do *chip* de DNA limita-se a um experimento por lâmina. Desse modo, para cada análise em microarranjo, uma nova lâmina deve ser

adquirida. Além disso, nem todos os genomas possuem *chips* com os seus genes prontos para comercialização.

Outra forma de estudo dos genes com o uso de microarranjos é o uso de lâminas compostas por fragmentos de seqüências de DNA, obtidas por meio de bibliotecas genômicas, utilizando a metodologia de *shotgun* (Fleischmann et al., 1995). Nessa abordagem, as seqüências dos clones são impressas nas lâminas antes de serem seqüenciadas. Desse modo, não se sabe previamente quais são e quantos são os genes presentes em cada clone. Nessa metodologia, os RNAm transcritos nas células, sob diferentes condições experimentais, são extraídos e hibridizados nas seqüências dos clones presentes no microarranjo. Pelo fato de muitas seqüências conterem mais de um gene, análises adicionais são necessárias para a confirmação dos genes expressos. As seqüências dos clones que hibridizaram de forma diferenciada em cada experimento são seqüenciadas e terão seus genes posteriormente identificados. Com os genes identificados, óligos específicos para cada gene são desenhados e submetidos a análises de expressão gênica, pelo método de PCR (do inglês *Polymerase Chain Reaction*) quantitativo em tempo real (Scott et al., 2006).

Uma abordagem alternativa às sínteses de oligonucleotídeos específicos nos estudos dos genes, com o uso de microarranjos de DNA, é a seleção dos clones de bibliotecas de DNA genômico contendo genes únicos. O uso dos clones com genes únicos possibilita a composição de microarranjo de DNA no qual se sabe, *a priori*, quais serão os genes presentes na lâmina. A seleção dos clones pode ser aplicada tanto em genomas procariotos, quanto eucariotos, estando eles completos ou parciais, assim como em projetos de metagenomas.

Em genomas parciais, os clones são identificados durante as fases de seqüenciamento e selecionados entre milhares de seqüências geradas durante o projeto. Nos genomas completos, as análises são baseadas em todos os clones usados na montagem final. Entre todos os clones do genoma, aqueles selecionados com genes únicos são denominados clones ótimos (Cantão et al., 2007), pois eles contêm as seqüências dos genes de interesse usados como abordagem alternativa às sínteses dos oligonucleotídeos.

Para tornar possível o processo de seleção dos clones com genes únicos, este trabalho apresenta como principal contribuição a elaboração das regras de identificação e seleção dos clones, não apenas para genomas procariotos parcialmente ou completamente seqüenciados, como também para projetos de metagenomas. Todas as regras de seleção são mapeadas em expressões algébricas por meio da álgebra de processos. Tal abordagem diferencia-se dos

trabalhos relacionados, pois permite maior precisão na definição e execução das regras de seleção, além da geração automática do código computacional.

1.2 Objetivos

O trabalho tem como principal objetivo criar as regras de seleção de clones ótimos e mapeá-las em álgebra de processos para que sejam usadas não apenas em genomas procariotos parcialmente ou completamente seqüenciados, como também para projetos de metagenomas sem a grande e indesejada necessidade de manutenção de código-fonte computacional, muito comum em ferramentas de bioinformática.

Além da elaboração das regras em álgebra de processos, o trabalho também tem como objetivo o desenvolvimento de uma interface *web* para auxiliar aos usuários no processo de criação das regras de seleção de clones ótimos.

1.3 Motivação

A motivação para a realização deste trabalho surgiu da necessidade de mapear todas as regras de seleção de clones ótimos em álgebra de processos e sua implementação em uma ferramenta que fosse capaz de identificar e selecionar clones de interesse entre milhares de seqüências de DNA, produzidas nos projetos genomas. Desse modo, o uso dos clones selecionados pelas regras como abordagem alternativa às sínteses de oligonucleotídeos nos estudos com microarranjo de DNA, diminui a demanda de recursos humanos e materiais nas análises com microarranjos, concomitante à montagem de genomas.

1. 4 Justificativas biológicas

No seqüenciamento de genoma, a fase final de montagem pela técnica de *shotgun* requer grandes esforços e recursos financeiros, tendo em vista o grande número de repetições na seqüência do DNA e diversas regiões do genoma ainda não seqüenciado. Tais problemas conduzem à necessidade de se aplicar diferentes estratégias a fim de alcançar o completo seqüenciamento do genoma (Roach et al., 2000). Uma vez o genoma completo, é possível iniciar o processo de síntese de oligonucleotídeos específicos para cada gene no genoma ou sondas de DNA, como forma de estudos funcionais dos genes.

Entre as vantagens do uso da abordagem de seqüências de *shotgun* com genes, destaca-se: a) a alternativa - síntese de oligonucleotídeos; b) o início das análises realizadas durante a fase de seqüenciamento, sem a necessidade de finalizar o genoma; c) o uso concomitante dos clones de *shotgun* em projetos com diferentes finalidades: montagem do genoma, composição de microarranjo de DNA para análises de expressão gênica e comparação de genomas por CGH; d) amplificação dos fragmentos gênicos sempre que necessários, ao contrário dos oligonucleotídeos que, periodicamente precisam ser sintetizados; e) definição de estratégias para interrupção do seqüenciamento.

Desse modo, é possível desenvolver diferentes projetos com o mesmo conjunto inicial de clones e adicionalmente possibilita a diminuição dos custos com a síntese de óligos e recursos humanos.

1. 5 Justificativas computacionais

Em projetos genomas, milhares de seqüências de DNA são produzidas durante as fases de seqüenciamento. Sendo assim, o uso de ferramentas computacionais torna-se crucial no auxílio às análises de milhares de dados gerados pelos seqüenciadores automáticos. Porém, *softwares* desenvolvidos para lidar com informações genômicas necessitam de atualizações freqüentes, a fim de adaptarem-se as recentes tecnologias e, também, a diferentes estratégias adotadas para cada projeto.

Com o propósito de assegurar precisão nos processos de alterações e execuções das regras realizadas pelos usuários, assim com na expansão de seleção de clones para novos projetos e genomas, o uso de uma abordagem algébrica proporciona a geração automática do

código que controla os fluxos do sistema e garante sua correta execução. A álgebra de processos apresenta-se como uma linguagem com alto poder de expressividade, possui grande flexibilidade e consistência para representar e mapear sistemas que necessitam de alterações frequentes em suas regras (Fokkink, 2000).

1. 6 Contribuições

A primeira versão das regras de seleção de clones implementado na ferramenta *OC Identifier* (Cantão et al., 2007), foi inicialmente desenvolvida para atender às necessidades encontradas nos projetos biológicos do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP – UNESP/Jaboticabal). Para tanto, com a ênfase voltada aos resultados da seleção dos clones, as regras foram inicialmente desenvolvidas para satisfazer aos parâmetros de buscas pré-definidos ao projeto, e o mesmo, implementado no código fonte da aplicação. Uma vez que a preocupação inicial foi de validar os experimentos biológicos, o uso de abordagens computacionais avançadas, por exemplo, a álgebra de processos na implementação das regras à ferramenta demandaria maior tempo para seu completo desenvolvimento. Desse modo, uma implementação com uma abordagem computacional tradicional foi realizada na primeira versão da ferramenta.

Com a validação dos resultados obtidos nos experimentos biológicos, o enfoque do trabalho voltou-se para a ampliação e aperfeiçoamento das regras de seleção de clones a diferentes projetos e organismos. Para isso, foi adotada a álgebra de processos como arcabouço formal no controle dos fluxos do sistema, e as regras passaram a ser mapeadas em expressões algébricas, o que proporcionou maior flexibilidade e eficiência no processo de seleção de clones implementado no *OCI 2* (Cantão et al., 2009).

Como contribuições, a ferramenta *OC Identifier* selecionou clones contendo genes únicos das bibliotecas genômicas da bactéria *Bradyrhizobium elkanii* Semia 587 para a confecção de um microarranjo de DNA, usados nos estudos de expressão gênica por Marcondes et al, (2008) em diferentes fases de crescimento da bactéria e por Pereira (2007) na comparação de genomas pela técnica de CGH. As primeiras análises de seleção foram realizadas na bactéria *B. elkanii* devido à sua importância na composição de inoculantes comerciais para a cultura de soja e, também, aos resultados na produtividade da agricultura do Brasil (MAPA, 2006).

1.6.1 Publicações

Este trabalho gerou publicações relacionadas à ferramenta de automação no processo de seleção de clones e nos resultados das análises dos clones selecionados.

Artigos

Periódico

1. **Cantão, M.E., Ferreira, J.E., Lemos, E.G.M.** (2007). Optimal clone identifier for genomic shotgun libraries: 'OC Identifier tool'. *Genet Mol Res*, 6: 743-55.

Publicados em anais de eventos

1. **Cantão, M.E., Araújo, L.V., Lemos, E.G.M., Ferreira, J. E.** (2009). Optimal Clone Identifier based on Dynamic Rules and Process Algebra. In: International Conference on Bioinformatics, Computational Biology, Genomics and Chemoinformatics. *International Society for Research in Science and Technology*, p. 92-99.
2. **Marcondes, J, Cantão, M.E., Alves, L.M.C., Lemos, E.G.M.** (2007). Transcriptional profile of *Bradyrhizobium elkanii* Semia 587 in symbiosis with soybean (*Glycine max* L. Merrill) analyzed by DNA microarray. In: *15th International Congress on Nitrogen Fixation & 12th International Conference of the African Association for Biological Nitrogen Fixation*, Cape Town - África do Sul. BNF Applications for Poverty Alleviation.

Aceito para publicação em anais de eventos

1. **Cantão, M.E., Araújo, L.V., Lemos, E.G.M., Ferreira, J. E.** (2010). Algebraic approach to optimal clones selection applied in metagenomic projects. In: *ACM International Symposium on Biocomputing*, Kerala, India;

Submetido para Periódico

1. **Marcondes, J., Cantão, M.E., Alves, L.M.C., Lemos, E.G.M.** Transcriptional Profiling of *Bradyrhizobium elkanii* in Defined and Complex Media Analyzed by DNA Microarray. Submetido para: *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*.

Capítulo de livro publicado

1. **Marcondes, J., Cantão, M.E., Alves, L.M.C., Lemos, E.G.M. (2008).** Transcriptional profile of *Bradyrhizobium elkanii* Semia 587 in symbiosis with soybean (*Glycine max* L. Merrill) analyzed by DNA microarray. *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture. Springer*, 42: 299-300.

Apresentação oral de trabalho em congresso

1. **Cantão, M.E., Araújo, L.V., Lemos, E.G.M., Ferreira, J. E. (2009).** Optimal Clone Identifier based on Dynamic Rules and Process Algebra. In: *International Conference on Bioinformatics, Computational Biology, Genomics and Chemoinformatics*, Orlando, FL, USA.
2. **Cantão, M.E., Ferreira, J.E., Lemos, E.G.M. (2006).** Optimal Clones Identifier for Genomic Shotgun Libraries: 'OC Identifier tool'. In: *ISMB 2006 and 2nd Annual AB3C Conference: X-meeting*, Fortaleza, CE.

Resumos publicados em anais de eventos

1. **Marcondes, J., Cantão, M.E., Kishi, L.T., Alves, L.M.C., Lemos, E.G.M. (2009).** Advance in Structural, Comparative, and Functional Analysis of *Bradyrhizobium elkanii* In: *16th International Congress on Nitrogen Fixation*, Montana, USA.

2. **Cantão, M.E., Lemos, E.G.M., Ferreira, J.E.** (2007). The use of OC identifier tool selecting optimal clones in finished genomes as an alternative to synthesis of primers for DNA Microarray analysis In: *Brazilian Symposium on Bioinformatics 2007 and International Workshop on Genomic Databases (IWGD'07)*, Angra dos Reis, RJ.
3. **Pereira, R.M., Cantão, M.E., Alves, L.M.C., Lemos, E.G.M.** (2007) Comparative Genomic Hybridization between *Bradyrhizobium elkanii* and *Sinorhizobium meliloti* using DNA microarrays In: *XXIII Reunión de la Asociación Latinoamericana de Rizobiología*, Córdoba, Argentina.
4. **Cantão, M.E., Pereira, R.M., Ferreira, J.E., Lemos, E.G.M.** (2006). *In silico* comparison between *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium elkanii* Semia 587 genomes. In: *GDEST - Global Dialogues on Emerging Science and Technology*, Petrópolis, RJ.
5. **Sader, A.P., Cantão, M.E., Lemos, E.G.M., Carrilho, E.** (2006). Multi-Dimensional Proteomic Analysis of *Bradyrhizobium elkanii* In: *XXXV Reunião Anual da SBBq*, Águas de Lindóia, SP.
6. **Cantão, M.E., Ferreira, J.E., Lemos, E.G.M.** (2005). Algorithm of selection of clones containing unique genes in partial genome for analyses in Microarray In: *International Workshop on Genomic Databases (IWGD'05)*, Rio de Janeiro, RJ.

1.7 Organização do texto

Este trabalho está organizado em 6 capítulos, como descrito a seguir:

Capítulo 1 – Introdução com objetivo, motivação, justificativas e contribuições.

Capítulo 2 – Fundamentos biológicos e computacionais necessários para a compreensão do trabalho;

Capítulo 3 – Trabalhos relacionados;

Capítulo 4 – Materiais e Métodos com a descrição das regras de seleção no projeto;

Capítulo 5 – Implementação das ferramentas, apresentação do ambiente de seleção de clones e mapeamento das regras em expressões da álgebra de processos;

Capítulo 6 – Resultados, conclusões e trabalhos futuros.

Capítulo 2

Fundamentos

Nesta seção serão apresentados os fundamentos básicos biológicos e computacionais que estão diretamente relacionados à compreensão do projeto e para o desenvolvimento da ferramenta de análise de clones. Nesse sentido, os conceitos biológicos abrangem o sequenciamento de DNA e a técnica de microarranjo, os quais são aplicados nas análises de expressão gênica e nas comparações de genomas por hibridização. Nos fundamentos computacionais, serão abordados os conceitos de *workflow* (Hollinsworth, 1995), álgebra de processos e NPD (do inglês *Language Navigation Plan Definition Language*) (Braghetto et al., 2006).

2.1 Fundamentos biológicos

O DNA ou ácido desoxirribonucléico é um tipo de ácido nucléico encontrado dentro das células dos organismos. É uma cadeia de polinucleotídeos, composto por quatro tipos diferentes de nucleotídeos, sendo eles: adenina (A), citosina (C), timina (T) e guanina (G). Cada nucleotídeo é composto por três partes, sendo elas: um açúcar, denominado desoxirribose, um grupo fosfato e uma base nitrogenada responsável por diferenciar cada um dos quatro tipos de nucleotídeos. A molécula de DNA é constituída de duas cadeias de nucleotídeos dispostas de modo antiparalelo. Ou seja, uma cadeia na direção 5' para 3', e a outra na direção oposta, de 3' para 5', como mostra a Figura 1.1. Ambas as cadeias são mantidas juntas por meio de ligações químicas, conhecidas como pontes de hidrogênio, por meio da qual a base adenina (A) se liga a timina (T), e citosina (C) a guanina (G) (Pierce, 2004).

Figura 1.1 – Representação da molécula de DNA

Outro tipo de ácido nucléico é o RNA, ou ácido ribonucleíco, o qual possui composição química similar ao DNA, cuja diferença está na composição química do açúcar que compõe o nucleotídeo, onde uma ribose está no lugar da desoxirribose, e na substituição da base nitrogenada timina (T) por uma uracila (U), como mostra na Figura 1.2.

Figura 1.2 – Representação da molécula de RNA

Uma unidade básica do código genético são os códons, formados pelo conjunto de três nucleotídeos que codificam um único aminoácido. Com três nucleotídeos por códon, existem 64 códons possíveis, o suficiente para representar 20 aminoácidos diferentes, sendo esses as unidades formadoras das proteínas. Porém, para que a síntese de proteína aconteça, é necessário que dois processos importantes ocorram dentro das células, chamados transcrição e tradução. A transcrição é o processo de síntese de RNAm pela RNA polimerase a partir da dupla fita do DNA, enquanto que a tradução é o processo pelo qual a mensagem codificada

pelo RNAm é traduzida pelos ribossomos, resultando na formação da cadeia polipeptídica correspondente (Pierce, 2004).

As fases do processo de transcrição e tradução podem ser vistos na Figura 2.

Figura 2 – Processo de transcrição do DNA em RNAm para a síntese de proteína

2.1.1 Sequenciamento de genoma

Um genoma consiste de todo material genético de um organismo, sendo constituído, geralmente, por uma ou mais moléculas de DNA na vasta maioria dos seres, ou RNA, no caso de algumas famílias de vírus. Já o sequenciamento é o processo que determina a ordem das seqüências de nucleotídeos ao longo da molécula de DNA.

Um dos objetivos do projeto de sequenciamento é a identificação dos genes presentes no genoma. Uma vez identificados os nucleotídeos dos genes, eles podem ser usados para inferir as seqüências de aminoácidos das proteínas. Desse modo, a proteína pode ser sintetizada ou isolada e suas propriedades estudadas para determinar sua função (Pierce, 2004).

2.1.2 Método de Sanger

No projeto de seqüenciamento, um procedimento muito utilizado para identificação das bases do DNA é o método de terminação da cadeia, também conhecido como método de Sanger (Sanger et al., 1977). Esse método é baseado na capacidade da enzima DNA polimerase estender a cadeia polinucleotídica a partir de um oligonucleotídeo iniciador (*primer*), ligado em uma das fitas molde por meio de reação de PCR. Como as fitas de DNA são complementares, a partir do molde, a enzima adiciona o nucleotídeo complementar no grupo hidroxila livre (OH) na posição 3', componente do desoxinucleotídeo anterior (dNTP).

Para identificar a seqüência de uma molécula de DNA, é necessário adicionar a essa reação nucleotídeos que interrompam a polimerização da cadeia, que são denominados didesoxinucleotídeo (ddNTP), nucleotídeos em que a pentose perdeu o grupo hidroxila da posição 3' (OH) necessário à continuidade da polimerização da cadeia. Durante os ciclos de polimerização, os ddNTPs são incorporados aleatoriamente, produzindo fragmentos de tamanhos diferentes. A mistura de fragmentos é submetida a um seqüenciador automático para a realização da eletroforese, técnica de separação de moléculas baseada em seu peso molecular e tamanho, por meio de uma diferença de potencial elétrico. Como a carga da molécula de DNA é negativa, as moléculas migram para o pólo positivo. As moléculas de menor tamanho e peso molecular migram mais rapidamente que as moléculas maiores e mais pesadas, criando uma ordenação dos fragmentos (Carraro e Kitajima, 2002).

Nos seqüenciadores automáticos, os diferentes ddNTPs estão ligados a moléculas fluorescentes, denominadas cromóforos, que, quando estimuladas por raio laser, emitem diferentes comprimentos de ondas, sendo reconhecidas por programas apropriados. Ao final do processo, a imagem gerada é chamada eletroferograma, com os picos representando a intensidade das cores lidas, e letras representando os nucleotídeos correspondentes aos picos, como mostram as Figuras 3.1 e 3.2.

Figura 3.1 – Amplificação dos fragmentos de DNA interrompidos por um ddNTP

Figura 3.2 – Eletroferograma, no qual cada pico representa uma base lida do DNA

2.1.3 Seqüenciamento de genoma pela técnica de *shotgun*

Para seqüenciar completamente um genoma bacteriano, ou regiões do DNA, que é longo demais para o seqüenciamento direto, uma abordagem muito utilizada é a técnica de *shotgun* (Fleischmann et al., 1995). Nessa abordagem, o DNA do organismo em questão é isolado e bibliotecas de DNA genômico são elaboradas e servem como molde para posterior seqüenciamento. As bibliotecas genômicas são produzidas por meio da quebra mecânica (sonicação ou nebulização) das seqüências de DNA, o que produz fragmentos aleatórios da seqüência do genoma. O produto obtido pela fragmentação é separado por tamanho, sendo que essa separação geralmente é realizada por meio de eletroforese em gel de agarose para extração e purificação dos fragmentos de DNA nos tamanhos desejados. O tamanho dos

fragmentos separados pode variar de 1 a 4 Kbp (1 Kpb = 1.000 pares de bases), dependendo da estratégia adotada (Carraro e Kitajima, 2002).

Os produtos da fragmentação são inseridos em vetores especiais, como plasmídeos, e então, inseridos em linhagens apropriadas de bactérias por processo denominado transformação. Esse processo consiste na inserção dos plasmídeos com os insertos do DNA genômico dentro de bactérias, como a *Escherichia coli*, para gerarem cópias idênticas dos fragmentos durante o processo de replicação. Durante o processo de replicação, as bactérias formam colônias e cada cultura de colônia individualizada será submetida à extração dos plasmídeos. Os plasmídeos extraídos contêm o inserto do DNA genômico do organismo em questão, e suas seqüências são obtidas ao serem submetidas à reação de seqüenciamento pelo método de Sanger (Carraro e Kitajima, 2002).

Durante a fase de seqüenciamento, periodicamente, realiza-se a montagem do genoma por meio de *softwares* específicos, tais como, phrap (<http://bozeman.mbt.washington.edu/phrap.docs/phrap.html>), CAP3 (Huang e Madan, 1999) TIGR Assembler (Sutton et. al., 1995). Esses programas utilizam algoritmos de alinhamento de seqüências textuais. Os passos resumidos para a montagem podem ser definidos em: leitura dos fragmentos já digitalizados, localização de redundâncias entre as seqüências de DNA e sobreposição dos fragmentos nas regiões em comum, formando seqüências maiores, os *contigs*. A montagem só é eficaz devido ao método aleatório de clonagem, que possibilita a redundância entre os fragmentos e permite assim que as seqüências sejam alinhadas umas às outras. Isso garante também a reconstituição da seqüência genômica original (Carraro e Kitajima, 2002). Após essa primeira etapa de montagem do genoma, fragmentos maiores são clonados em cosmídeos e seqüenciados. Essa segunda etapa é importante para a montagem do genoma completo do organismo, já que a primeira normalmente produz seqüência incompleta, apresentando algumas regiões não seqüenciadas (Prosdocimi et al., 2002).

Em projetos genomas de organismos eucariotos, que geralmente possuem grandes seqüências de DNA, normalmente prefere-se adotar uma técnica conhecida como *shotgun* hierárquico. Nessa técnica, o DNA inteiro do organismo é primeiramente inserido em grandes vetores de clonagem, como cromossomos artificiais de bactérias (BAC, do inglês *Bacterial Artificial Chromosome*) ou de leveduras (YAC, do inglês *Yeast Artificial Chromosome*). Depois é realizado um *shotgun* desses grandes fragmentos dos vetores, gerando assim, fragmentos menores que são agora clonados em vetores plasmidiais para o seu

seqüenciamento. Portanto, tais projetos consistem de duas etapas, a montagem de cada um dos grandes fragmentos clonados nos BACs e YACs, e montagem final que reunirá as seqüências completas dos BACs e YACs para a reconstituição da informação genômica inicial (Prosdocimi et al., 2002).

2.1.4 Pirosequenciamento

A nova geração de seqüenciadores realiza o seqüenciamento de DNA em tempo real e se baseia na técnica de detecção do pirofosfato (PPi, do inglês *Pyrophosphate*), liberado durante a síntese de DNA. Em uma seqüência de reação enzimática, a luz visível emitida é usada na detecção do nucleotídeo incorporado à seqüência do DNA (Ronaghi, 2001). O piroseqüenciador possibilita o seqüenciamento de milhões de bases em poucas horas e conta com a vantagem de dispensar as etapas de clonagem, utilizada pelo método de Sanger (Goldberg et al., 2006).

Embora essa metodologia permita o seqüenciamento de genomas em poucas horas, o pirosequenciamento tem como limitação de sua tecnologia, a produção de pequenas seqüências de DNA que variam entre 50 e 350 bases por *read*. Com fragmentos curtos, adota-se a abordagem chamada seqüenciamento híbrido, a qual faz uso concomitante de seqüências produzidas pelo método de Sanger e pirosequenciamento no auxílio às ferramentas de montagem de genomas (Chaisson e Pevzner, 2008).

Segundo Goldberg et al. (2006), empregar o uso do seqüenciamento híbrido é uma abordagem capaz de produzir alta qualidade com baixo custo de seqüenciamento e, ao mesmo tempo, solucionar os problemas encontrados durante os projetos genomas por ambas as técnicas. Sendo assim, Goldberg definiu as estratégias para o melhor custo-benefício em ambas as abordagens de seqüenciamento. A estratégia foi baseada em resultados obtidos no seqüenciamento de 6 genomas microbianos. A Figura 4 aborda as melhores estratégias a serem aplicadas aos projetos genomas, a fim de produzir montagens de alta qualidade aliadas ao baixo custo.

Figura 4 – No seqüenciamento de organismos com genomas menores de 3Mb e/ou baixo número de *gaps* e/ou alto número de regiões repetitivas, foi feita a cobertura do genoma 8 vezes pelo método de Sanger para alcançar a abordagem de melhor custo-benefício. Aos organismos maiores de 3 Mb, e/ou muitos *gaps* nas seqüências, e/ou muitas regiões com paradas bruscas durante o seqüenciamento, foi usado um seqüenciamento inicial cobrindo 5 vezes o genoma pela método de Sanger, seguidos de 2 corridas usando o piroseqüenciamento para alcançar a abordagem de melhor custo-benefício

No trabalho realizado por Goldberg, o seqüenciamento pelo método de Sanger obteve melhores resultados em relação ao custo-benefício quando aplicado ao seqüenciamento de genomas menores que 3 Mb (milhões de bases) e/ou baixo número de *gaps*, e/ou alto número de estruturas repetitivas, enquanto a técnica que utiliza o seqüenciamento híbrido obteve melhores resultados quando aplicada a genomas maiores que 3 Mb e/ou muitos *gaps*, e/ou muitas regiões com dificuldades de seqüenciamento por apresentarem paradas bruscas (*hard stops*). Já o piroseqüenciamento foi recomendado apenas para o reseqüenciamento de genomas, isto é, genomas que possuem seqüências como referência.

2.1.5 Plataforma de seqüenciamento Solid e Solexa

Além do piroseqüenciamento (conhecido como 454) desenvolvida pela empresa Roche®, existe outras plataformas de seqüenciamentos, tais como Solid (desenvolvida pela Applied biosystems®) e Solexa (desenvolvida pela Illumina®). Uma diferença fundamental

entre as plataformas da nova geração de seqüenciamento (454, Solid e Solexa) é o tamanho e a quantidade de fragmentos produzida por cada uma delas. Por exemplo, enquanto uma corrida de 454 produz em média 1 milhão de *reads* de fragmentos variando entre tamanho de 200 a 400 bases, o Solid e Solexa produzem em torno de 100 milhões de *reads* variando o tamanho entre 50 e 75 bases. Sendo assim, o uso da plataforma Solid e Solexa é recomendado para o reseqüenciamento de genomas, transcriptomas, metatranscriptomas, identificação de polimorfismos, enquanto que a plataforma 454 é recomendada para o seqüenciamento de novos genomas (Dohm et al., 2007).

2.1.6 Técnica de microarranjo de DNA

Muitos indícios importantes sobre o funcionamento gênico vieram do conhecimento de quando e onde os genes se expressam. Dessa forma, a análise simultânea da expressão de milhares de genes, em um único experimento, possibilitou que a técnica de microarranjo de DNA se tornasse ferramenta poderosa quando aplicada em estudos funcionais gênicos. O emprego da técnica de microarranjo de DNA tem permitido grande avanço nos estudos de expressão gênica em vegetais, humanos, diversos gêneros de bactérias e leveduras. Em relação aos sistemas microbianos, áreas como fisiologia, patogênese, epidemiologia, ecologia, filogenia, vias de manipulação e otimização da fermentação tornaram-se tópicos comuns de aplicação de microarranjos de DNA (Yeo et al., 2001; Letowski et al., 2003).

Contudo, a técnica de microarranjos de DNA é baseada na hibridização de ácidos nucléicos, na qual um fragmento conhecido de DNA é usado como uma sonda para encontrar seqüências complementares. A sonda em geral é fixada em algum suporte sólido, tal como filtro de *náilon* ou lâmina de vidro. Qualquer seqüência de ácido nucléico que seja complementar à sonda irá se ligar a ele. Os ácidos nucléicos na mistura são marcados com um marcador radioativo ou fluorescente, de modo que as moléculas ligadas à sonda possam ser facilmente detectadas (Pierce, 2004).

Em um microarranjo (também chamado *chip* de genes), vários fragmentos de DNA conhecidos são fixados a um suporte sólido em padrão ordenado, ou arranjo, em geral como uma série de pontos. Esses fragmentos de DNA (as sondas) em geral correspondem a genes conhecidos. Quando o microarranjo tiver sido elaborado, os RNAm, DNA ou DNA complementar (DNAc), isolados de células experimentais são marcados com nucleotídeos

fluorescentes e aplicados ao arranjo. Qualquer uma das moléculas de DNA ou RNA que são complementares às sondas no arranjo irão se hibridizar com elas e emitir fluorescência, que pode ser detectada por um *scanner* automatizado. Arranjo contendo dezenas de milhares de sondas pode ser aplicado a uma lâmina de vidro com alguns centímetros de tamanho (Pierce, 2004).

A Figura 5 ilustra um processo experimental básico de microarranjo de DNA, no qual os clones de DNA, contendo seqüências gênicas, são amplificados por meio de PCR e impressos em uma lâmina de vidro. Os RNAm de células experimentais são convertidos em DNA complementares e marcados com nucleotídeos de fluorescência vermelha. Os RNAm das células controle são convertidos em DNA complementares e marcados com nucleotídeos de fluorescência verde. Os DNA complementares marcados são misturados e hibridizados às sondas de DNA contidas em uma lâmina.

Figura 5 – Esquema ilustrativo dos procedimentos da técnica de microarranjo de DNA

Após o processo de hibridização, a lâmina é escaneada e obtêm-se duas imagens, sendo uma para o comprimento de onda vermelho e outra verde. A intensidade dos pontos observados indica a eficiência da hibridização da sonda contida no microarranjo com os alvos de DNA complementares marcados fluorescentemente. As duas imagens obtidas são sobrepostas por meio de programas específicos e o resultado da sobreposição é analisado. A cor vermelha indica a hiperexpressão de um gene nas células experimentais em relação a das

células controle, enquanto verde indica a subexpressão de um gene nas células experimentais em relação ao das células controle. Amarelo indica expressão igual nas células controle e experimental, e nenhuma cor indica falta de expressão tanto nas células experimentais quanto nos controles (Pierce, 2004).

2.1.7 Técnica de CGH

A técnica de comparação de genomas por hibridização (CGH) utiliza microarranjo de DNA e possibilita a comparação de genomas completos, ou grandes conjuntos de genes de uma estirpe seqüenciada, como método alternativo às técnicas de comparação gênicas, baseadas em um ou poucos genes (Porwollik et al., 2002).

Na técnica de CGH, a hibridização gênica de um genoma no microarranjo, identifica genes que estão ausentes, presentes ou que são altamente divergentes do genoma de referência. No entanto, o relacionamento genético é determinado baseado nos padrões de presença e ausência dos genes entre os genomas. Essa técnica pode ser usada para inferir relacionamentos filogenéticos, pois, um único arranjo pode conter centenas ou milhares de fragmentos de DNAs. Desse modo, uma simples lâmina tem o potencial de identificação de amplo número de microrganismos ou genes de uma só vez, proporcionando que mais informação seja incorporada em uma análise (Edwards-Ingran et al., 2004).

2.1.8 Tipos de microarranjo

A plataforma sólida mais utilizada na confecção dos arranjos é a lâmina de vidro, do tipo usado em microscopia, que depois de ter as sondas imobilizadas na sua superfície, é normalmente referida como *slide* ou simplesmente lâmina de microarranjo. Basicamente existem duas formas de distribuir as sondas em um microarranjo de DNA. A primeira, mais simples, é feita por robôs de alta precisão que utilizam agulhas especiais para depositar as amostras de DNA na superfície de uma lâmina de vidro, processo que também é conhecido como “impressão do *slide*”. Normalmente essas amostras são constituídas de oligonucleotídeos pré-sintetizados, DNAs complementares produzidos em projetos de seqüenciamento, ou, ainda, produtos de amplificação por PCR. A segunda, mais complexa,

utiliza processos especiais (por exemplo, fotolitografia) para realizar a síntese química de oligonucleotídeos diretamente sobre a superfície da lâmina de vidro (Rosa et al., 2007).

Entretanto, a tecnologia básica de microarranjo apresenta diversas variações, dependendo do substrato (lâminas de vidro ou de sílica), tipo de sonda (oligonucleotídeos de cadeia curta, oligonucleotídeos de cadeia longa, DNAc ou produtos de PCR), do método de deposição das amostras (impressão por robôs ou síntese baseada na tecnologia de semicondutores), além de variedade de técnicas de extração e marcação do RNA, bem como de protocolos de hibridização. Dessa maneira, diversos tipos de lâminas podem ser encontrados para espécies animais e vegetais, as quais são produzidas por empresas ou por instituições de pesquisa e universidades (Rosa et al., 2007).

2.1.9 Metagenoma

Metagenoma é o nome dado ao estudo do conteúdo genômico de uma mistura complexa de microrganismos encontrados em um determinado *habitat*. Os principais objetivos desses estudos são identificar as populações de microrganismos que estão presentes em uma microbiota para, em seguida, identificar as funções que cada microrganismo tem dentro desse ambiente. Amostras metagenômicas podem ser obtidas a partir dos mais diferentes ambientes, incluindo vários microambientes dentro do corpo humano, amostras de solos, ambientes extremos, tais como minas profundas e as várias camadas dentro dos oceanos. Portanto, devido à existência de microrganismos nas diversas condições ambientais existentes no planeta, a diversidade de microrganismos é estimada na escala de dezenas a centenas de milhões de espécies (Harkins e Jarvie, 2007).

Atualmente, duas abordagens são comumente usadas para o seqüenciamento de amostras metagenômicas. Na abordagem tradicional, o DNA é clonado em BACs ou Cosmídeos e o processo de seqüenciamento pelo método de Sanger é usado para determinar as seqüências nucleotídicas. A nova abordagem utiliza as plataformas avançadas de seqüenciamento de DNA. Com o piroseqüenciamento, o DNA metagenômico é seqüenciado diretamente sem a etapa de clonagem, possibilitando a identificação de um maior número de genes e diminuindo o custo de execução dos projetos de metagenômica (Meyer et al., 2008).

2.2 Fundamentos computacionais

Tendo em vista o grande volume de dados a serem processados em diversos tipos de projetos de bioinformática, torna-se necessário o uso de ferramentas computacionais para auxílio às análises diárias dos experimentos laboratoriais. Para tanto, o desenvolvimento de sistemas de *workflow* (fluxo de trabalho), tem por finalidade ajudar o pesquisador nas execuções de suas tarefas, de modo a fornecer controle automatizado das atividades laboratoriais. Nessa seção são apresentados conceitos sobre *workflow* (Hollinsworth, 1995), álgebra de processos (Fokkink, 2000) e NPD (Braghetto et al., 2006).

2.2.1 WorkFlow

Um conceito bastante difundido em sistemas gerenciadores de processos de negócio é o de *workflow* (Hollinsworth, 1995). Um *workflow*, segundo a definição da WfMC (do inglês *Workflow Management Coalition*) é a automação do processo de negócio, na sua totalidade ou em partes, por meio da qual documentos, informações ou tarefas são passados de um participante ao outro para execução de uma ação, de acordo com um conjunto de regras procedurais (Hollinsworth, 1995). Também segundo a WfMC, um sistema de gerenciamento de *workflow* (WFMS, do inglês *Workflow Management System*) é um sistema que define, cria e gerencia a execução de *workflows* por meio do uso de *software*.

Em bioinformática, como em outras áreas, muitas das tarefas a serem executadas pelos pesquisadores envolvem o uso de vários *softwares*. Assim, uma coleção de dados produzidos por um programa pode ser o conjunto de dados de entrada para o próximo programa. No entanto, o controle da execução desses programas, em projetos complexos, não é tarefa trivial. Dessa maneira, reforça a importância do uso de *workflows* científicos (*workflow* utilizado na execução de atividades em experimentos científicos) (Ludäscher et al., 2005).

Como exemplo de *workflow* em bioinformática, pode-se citar o pacote phred/phrap/consed (Nickerson et al., 1997). Esse pacote contém um *script* que controla os passos a serem executados em cada fase da montagem do genoma. Além dos *scripts* prontos, geralmente os pesquisadores utilizam linguagens de *scripts* para implementar os seus próprios

workflows, tendo em vista os recursos que essas linguagens oferecem para fazer chamadas de programas.

Entretanto, para o controle confiável de execução de fluxos de sistemas é fundamental a utilização de linguagens que forneçam subsídios para a modelagem e para o controle dos processos dos sistemas. Entre essas linguagens, pode-se citar redes de Petri (Murata, 1989) e a álgebra de processos (Fokkink, 2000).

2.2.2 Padrões básicos de controle de fluxo

No intuito de criar um padrão de controle e execução de fluxo de sistemas, Aalst et al. (2003) têm trabalhado na definição, desde as formas básicas às mais complexas de controle de fluxos, independente de uma linguagem de especificação. Nesse esforço, 20 padrões de controle de fluxos em *workflows* foram definidos (Aalst et al., 2003). Os padrões básicos de controle de fluxo referem-se a construções básicas, presentes na maioria das linguagens de modelagem de *workflows*.

A seguir, os cinco padrões básicos de controle de fluxos serão apresentados.

- **Padrão 1. Seqüência**

Série ordenada de atividades, na qual uma atividade é habilitada para execução somente depois que a atividade anterior terminou a sua execução.

Figura 6.1 – Seqüência

Exemplo: a atividade **B** só é habilitada para execução após o término da execução de **A**.

- **Padrão 2. Divisão paralela**

Um ponto no processo no qual um caminho único de fluxo é dividido em dois ou mais caminhos, de forma que duas ou mais atividades possam começar simultaneamente ou em qualquer ordem.

Figura 6.2 – Divisão paralela

Exemplo: a atividade **A** é executada e habilita a execução de **B** e **C** em paralelo (ou seja, em qualquer ordem ou simultaneamente).

- **Padrão 3. Sincronização**

Um ponto no processo, no qual múltiplas atividades paralelas convergem para um caminho único de fluxo. Todas as atividades devem estar finalizadas para que o processo possa continuar.

Figura 6.3 – Sincronização

Exemplo: a atividade **C** é habilitada somente depois que **A** e **B** tiverem sido executadas

- **Padrão 4. Escolha exclusiva**

Um ponto no processo no qual, baseado em uma decisão ou nos dados de controle do *workflow*, um, entre os diversos caminhos, é escolhido. Assim, o caminho divide-se em alternativas exclusivas.

Figura 6.4 – Escolha exclusiva

Exemplo: as atividades **B** e **C** são habilitadas após a execução de **A**, mas somente uma delas será escolhida implicitamente para a execução.

- **Padrão 5. Junção simples**

Um ponto no processo no qual dois ou mais caminhos alternativos se juntam, sem ser necessária a sincronização. Assume-se, nesse padrão, que não ocorre execução em paralelo nos diversos caminhos alternativos.

Figura 6.5 – Junção simples

Exemplo: inicialmente, as atividades **A** e **B** estão habilitadas; após a execução de uma delas, **C** é habilitada.

Com a definição desses cinco padrões básicos de controle de fluxos é possível controlar e gerenciar a execução dos processos de diversos projetos. A descrição mais detalhada de todos os padrões de controle de fluxo pode ser encontrada em Aalst et al. (2003).

2.2.3 Álgebra de processos

De maneira geral, podemos definir que o comportamento de um sistema de computação consiste de processos e dados (Fokkink, 2000), no qual os processos são os mecanismos de controle para a manipulação dos dados. Um sistema de computação é composto por vários processos que são executados concorrentemente.

Devido à relação entre os processos, o comportamento de um sistema pode ser representado por meio de grafos de processos. Nesse caso, um conjunto de nós ou vértices é usado para representar os estados do sistema e as arestas rotuladas entre os nós para representar as transições de estados. A álgebra de processos (Fokkink, 2000) trata da especificação e manipulação de processos por meio de uma coleção de operadores, constituindo um arcabouço formal para os processos e dados. A avaliação das expressões da álgebra de processos permite detectar propriedades indesejáveis e formalmente produzir propriedades desejáveis.

A álgebra de processos de acordo com Fokkink (2000) é composta por um conjunto de ações (ou eventos), um conjunto de operações e um conjunto de axiomas descrevendo as

propriedades dos operadores. A álgebra de processos contém operadores básicos e operadores para controles avançados, adicionalmente pode ser estendido com novos operadores para aumentar o seu poder de expressividade ou facilitar a especificação do comportamento de sistemas (Bergstra et al., 2001).

A possibilidade de criar novos operadores permite que diferentes padrões de álgebras de processos sejam criados, tais como: CCS (do inglês *Calculus of Communicating Systems*) (Milner, 1982), CSP (do inglês *Communicating Sequential Processes*) (Hoare, 1978) e a ACP (do inglês *Algebra of Communicating Processes*) (Bergstra et al., 2001), sendo esta última usada como referência para o desenvolvimento deste trabalho.

Com objetivo de atender aos requisitos básicos de controles de fluxos, os operadores básicos padrões usados na modelagem em álgebra de processos são definidos da seguinte forma:

- a) **Composição seqüencial** - operador ($\cdot$): o termo de processo $A \cdot B$ significa que, inicialmente, somente o termo A está habilitado para execução. O termo B será habilitado para execução somente após o fim da execução de A ;
- b) **Composição alternativa** - operador ($+$): o termo de processo $A + B$ significa que, inicialmente, ambos os termos A e B estarão habilitados para execução. Porém, somente um deles será executado;
- c) **Composição paralela** - operador ($\parallel$): o termo de processo $A \parallel B$ significa que os termos A e B podem ser executados paralelamente, dividindo a linha de controle em duas.

A descrição detalhada de todos os operadores da álgebra de processos pode ser encontrada em Fokkink (2000).

2.2.4 NPDL – Linguagem para definição de plano de navegação

Com o objetivo de viabilizar o controle de processos de negócio para um modelo relacional de dados, foi criada a NPDL (Braghetto et al., 2006). Essa linguagem é uma extensão da linguagem SQL (do inglês *Structured Query Language*) e se baseia no conceito

de plano de navegação da arquitetura RiverFish (Ferreira et al., 2006), e em operadores de álgebra de processos. Assim como na álgebra de processos, processos em NPDL são definidos por expressões algébricas envolvendo ações e operadores.

A linguagem NPDL utiliza a álgebra de processos como arcabouço formal para oferecer subsídios para a criação, execução e gerenciamento de processos descritos nas expressões da álgebra de processos. O uso da NPDL possibilita que expressões da álgebra de processos sejam tratadas sem que os usuários necessitem desenvolver interpretadores específicos para o tratamento sintático dessas expressões.

A seguir, serão apresentados alguns operadores da NPDL, usados nos controles das regras de seleção dos clones ótimos.

- a) **Composição paralela entrelaçada** (operador $|*$): o termo de processo $A|* B$ significa que os termos A e B podem ser executados em qualquer ordem (exemplo: $A.B + B.A$), mas não podem ser executados de forma paralela.
- b) **Composição multiconvergente** (operador $\&$): o termo de processo $A \& B$ significa que o termo B será habilitado para execução após o término da execução de cada linha de controle do termo A . Por exemplo, o processo $P = (A \parallel B) \& C$ indica que C será habilitado para execução duas vezes: uma após o término da execução do processo A e outra após o término da execução do processo B .
- c) **Execução condicional** (operador $\%r$ sendo r , uma regra que retorna um valor *booleano*): o termo de processo $\%r A$ significa que o termo A será habilitado para execução se o valor de retorno da regra r (avaliada em tempo de execução) for verdadeiro. O complementar da execução condicional é representado por $\%!r$, nesse caso, o termo A será executado caso a regra r retornar um valor falso.

Além dos operadores anteriormente descritos, a NPDL contém comandos que são usados para criar e definir os processos, como mostrados a seguir.

- **CREATE** - usado para criar os processos, regras e ações que serão definidas na expressão algébrica, por exemplo:

- CREATE Process P ;
- CREATE Rule r ;
- CREATE Action A, B ;

- **SET** - usado para atribuir uma expressão algébrica a um processo, por exemplo:

- SET $P = \%r (A . B) + \%!r (C)$;

A seguir, um exemplo de uma expressão em NPD L e sua definição.

- $P = \%r (A . B) + \%!r (C)$;

Nessa expressão, P representa o processo que avalia o resultado da regra r e decide qual a próxima ação a ser executada. Se a regra r retornar um valor verdadeiro, primeiro será executada a ação A e, após o seu término, a ação B é habilitada para execução. Caso a regra r retorne um valor falso, somente a segunda parte da expressão será habilitada. Dessa forma, a ação C será habilitada para execução.

A descrição detalhada de todos os operadores da linguagem NPD L pode ser encontrada em Braghetto et al. (2007).

Capítulo 3

Trabalhos relacionados

Um dos pré-requisitos para o uso da tecnologia de microarranjo de DNA, nas análises de expressão gênica e comparação de genomas por CGH é o uso de lâminas com a presença de seqüências gênicas conhecidas. Tais seqüências podem ser obtidas por meio da síntese de oligonucleotídeos específicos para cada gene do genoma. A abordagem que sintetiza oligonucleotídeos em genomas fechados e anotados possibilita a identificação prévia de quais serão os genes presentes na lâmina. Essa abordagem foi adotada por Koide et al. (2004), para criar um microarranjo de DNA com seqüências gênicas conhecidas nos estudos de expressão gênica de duas estirpes da bactéria *Xylella fastidiosa*, sendo uma delas fitopatogena. Nesse trabalho, foram produzidas 2.692 seqüências de produto de PCR para criar o arranjo de DNA pela síntese oligonucleotídeos específicos (Koide et al., 2004).

Outro modo de compor o microarranjo para fins de análises de expressão gênica e CGH é por meio de sínteses de sondas de DNA específicas para cada gene do genoma. No trabalho de Giuntini et al. (2005), 6.229 sondas foram usadas nos estudos de comparação de genomas por hibridização (CGH) entre quatro diferentes estirpes da bactéria *Sinorhizobium meliloti*, com o intuito de analisar a variação genética em nível genômico. Nos experimentos conduzidos por Hauser et al. (2006), em análises de expressão gênica, foram sintetizadas 738 sondas de DNA para estudo do perfil transcricional nas análises simbióticas de genes de fixação de nitrogênio da bactéria *Bradyrhizobium japonicum*.

Entretanto, nem só em bactérias a técnica CGH vem sendo empregada, ela também tem sido utilizada com sucesso na comparação de estirpes de leveduras usando microarranjos como os de Watanabe et al. (2004). Esse estudo comparou estirpe de leveduras usando um microarranjo com sondas de 6.000 genes de *Saccharomyces cerevisiae* S288C, para obter informações sobre a determinação de espécies e alterações no número de cópias de genes entre elas.

3.1 Microarranjos compostos por clones de *shotgun*

A abordagem usando seqüências produzidas pela técnica de *shotgun* para criar microarranjos, no qual os genes são identificados após o processo de hibridização e seqüenciamento dos clones, foi utilizada por Scott et al. (2006), no estudo da bactéria *Roseburia inulinivorans* estirpe A2-194. Esse trabalho identificou genes que são diferencialmente expressos durante as fases de crescimento em meio de cultura contendo glucose ou fucose, através de microarranjo composto por 4.884 clones de tamanho variando de 1 a 2 kb. Após a hibridização, 80 clones foram selecionados por análises estatísticas e seqüenciados completamente, com o intuito de identificar os genes presentes em suas seqüências. Nessa abordagem, os clones presentes na lâmina podem conter seqüências de mais de um gene, portanto, impede de saber *a priori* quais deles foram realmente expressos. Com os genes identificados, óligos específicos para cada gene foram sintetizados e submetidos a análises de expressão gênica pelo método de PCR quantitativo em tempo real (Scott et al., 2006).

Clones de *shotgun* da bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* foram selecionados por Moreira (2006), para compor um microarranjo de DNA. A seleção dos clones inicialmente foi realizada *in silico* através de *scripts* em linguagem Perl, com critérios específicos para os dados contidos no banco do genoma completo da *X. citri*. Por meio de análises *in silico*, 4.421 clones dos 46.462 disponíveis para análises foram selecionados. Após análises *in silico*, 1.782 clones foram descartados do projeto por apresentarem problemas, sendo eles: ORFs (do inglês *Open Reading Frame*) com fragmentos pequenos (menores que 200 bases) ou ORFs diferentes dos inicialmente identificados nos clones após os seus reseqüenciamentos. Desse modo, 2.639 clones foram usados para compor o microarranjo de DNA e usados nas análises estrutural e funcional do genoma da *X. citri* (Moreira, 2006).

O uso de clones de *shotgun* em microarranjos também foi utilizado em organismos superiores, como no caso da análise em uma região do cromossomo humano conduzido por Li et al. (2004). Nesse trabalho, a região 4q22-24 do cromossomo humano, que possui tamanho aproximado de 1.7 Mb, estava representada na lâmina por seqüência de clones de *shotgun*. O intuito das análises de hibridizações foi à localização de novas regiões de transcritos ainda não identificados pelos métodos tradicionais, sendo eles por *softwares* de predição de seqüências de *exons*, ou regiões identificadas pelo seqüenciamento de ESTs (do inglês

Expressed Sequence Tag). As bibliotecas de DNAs complementares, alvos das hibridizações, foram extraídas dos seguintes tecidos: pulmão, fígado, medula óssea e cólon. Após as análises de hibridização entre os diferentes tecidos, foi possível a identificação de 166 novos transcritos de genes que anteriormente não constavam como *exons* por *softwares* preditores ou mesmo identificados no seqüenciamento de ESTs. Adicionalmente, foi identificada a presença de um *splicing* alternativo e a possível presença de um pseudogene. Portanto, o uso de microarranjo de seqüências de clones de *shotgun* demonstrou ser útil na identificação de novos transcritos e *loci* de genes conhecidos, como também em análises de *splicing* alternativo e no estabelecimento de ligação entre ESTs em genomas de eucarioto (Li et al., 2004).

3.2 Análises em metagenomas

Em projetos de metagenomas, o uso de bibliotecas de DNA de cosmídeos impressos em microarranjos é um método comumente usado na identificação de genes de interesse. Nessa abordagem, as seqüências dos clones presentes na lâmina são hibridizadas contra as seqüências de sondas sintetizadas contendo parte dos genes. Os clones hibridizados são fragmentados, sub-clonados e seqüenciados para que os genes identificados possam ser usados em análises funcionais (Pathak et al., 2009).

Uma abordagem alternativa a hibridização dos clones em microarranjos para identificar genes de interesse em bibliotecas metagenômicas é a análise função-dirigida, conhecida como *function-driven screening*. Nessa análise, os clones (geralmente Cosmídeos ou Fosmídeos) que contém os genes de interesse são identificados ao serem expressos em condições *in vitro* (como meios de cultura contendo um indutor apropriado) e selecionados para o seqüenciamento. Por meio dessa abordagem, Kim et al. (2009) isolaram e seqüenciaram completamente um clone contendo genes envolvidos na biossíntese de porfirinas a partir de uma biblioteca metagenômica composta por 107.000 clones de fosmídeos.

3.3 Ferramentas de bioinformática

Como apresentado nos projetos de seqüenciamento, para a comparação de genomas e análises de expressão gênica, as ferramentas de bioinformática têm importante papel no

auxílio às análises dos dados, no controle e na automatização dos processos. Desse modo, algumas ferramentas de bioinformática oferecem um conjunto integrado de funções, nas quais realizam tarefas específicas para cada fase do projeto. Uma ferramenta que tem essa propriedade de integrar funções é o SABIA - *System for Automated Bacterial Integrated Annotation*, um sistema que proporciona o controle e a execução de programas de análises em dados biológicos, empregado nos serviços de análises de seqüências, montagem de genomas bacterianos, predição e anotação dos genes (Almeida et al., 2004). Além do *software* SABIA, outras ferramentas de bioinformática usadas nos projetos genomas, com função de predição gênica e de anotação de genes são: GenDB (Meyer et al., 2003); Artemis (Rutherford et al., 2000); ERGO (Overbeek et al., 2003); GATO (Fujita et al., 2005), entre outras. Porém, entre as ferramentas de bioinformática citadas, nenhuma delas proporciona a geração automatizada dos fluxos dos processos por meio de um arcabouço algébrico, no qual garante precisão nas alterações e execuções das tarefas realizadas pelos usuários. O uso de álgebra de processos proporciona flexibilidade e eficiência para ferramentas de bioinformática.

3.4 Workflow científico

Um sistema de gerenciamento de *workflow* científico é desenvolvido especialmente para compor e executar uma série de passos, como também para gerenciar dados e tarefas computacionais relacionados especificamente na área científica. Atualmente, existem vários sistemas de *workflows* desenvolvidos para serem utilizados por cientistas nas áreas de astronomia, ciências da Terra e bioinformática.

Entre os sistemas de *workflows* desenvolvidos para área de bioinformática podemos citar:

- BioManager: *workflow* desenvolvido para análises e gerenciamento de dados de bioinformática (Cattley e Arthur, 2007);
- Ergatis: sistema baseado na *web* para criar, executar e monitorar *pipelines* de análises em bioinformática. Ele contém alguns componentes de análises de dados de bioinformática embutidos em seu sistema. A execução dos componentes é organizada de modo gráfico, assim permite criar *pipelines* altamente configuráveis (<http://ergatis.sourceforge.net>);

- EGene: *software* que oferece controle na execução dos processos, sendo um sistema gerador de *pipelines* configurável para análises automatizadas de seqüências de DNAs, ESTs e montagem de genomas (Durham et al., 2005);

- Pegasys: *software* para execução e integração nas análises de seqüências biológicas (Shah et al., 2004).

- HCDC: banco de dados biológico para visualização, gerenciamento e publicação de imagens de experimentos biológicos (<http://hcdc.ethz.ch>).

O uso de sistemas gerenciadores de *workflows* científicos auxilia no gerenciamento de tarefas corriqueiras desenvolvidas nos laboratórios, e fornece subsídio para organizar todos os processos e fluxos de um sistema.

Capítulo 4

Materiais e métodos

Para o desenvolvimento das regras de seleção de clones, primeiramente foi necessário entender a metodologia usada na montagem de genomas por meio da técnica de *shotgun* (Fleischmann et al., 1995). Por meio dessa técnica, as seqüências dos clones amplificadas pelos oligonucleotídeos universais *forward* (senso) e *reverse* (anti-senso), aparecem difundidas entre as milhares de seqüências do genoma e podem ser encontradas em diferentes situações, sendo elas: *singlet/singlet*; *singlet/contig*; interna a região de um *contig* ou em diferentes *contigs*. Além dos clones, muito dos genes terão seqüências incompletas, devido às regiões do genoma ainda não seqüenciadas, chamadas *gaps* (buracos). Entretanto, para as buscas aos clones ótimos em genomas parciais, foram desenvolvidas regras específicas para tratar cada situação em particular. Tais regras foram primeiramente elaboradas implementadas na primeira versão da ferramenta de seleção de clones ótimos, *OC Identifier tool* (Cantão et al., 2007).

Uma vez que a atenção estava voltada a uma rápida seleção de clones e aos resultados dos experimentos biológicos, as regras de seleção foram implementadas sem o uso de abordagens computacionais avançadas, cujo desenvolvimento demandaria maior tempo e dedicação para serem desenvolvidas. Sendo assim, todas as regras foram definidas no código fonte da aplicação, na qual necessita de maiores esforços para realizar alterações nas regras, como também no controle do fluxo do sistema.

Com os resultados obtidos nos experimentos biológicos validados, as regras de seleção de clones foram ampliadas e aperfeiçoadas para serem usados em novos organismos e projetos. Desse modo, durante o processo de expansão, todas as regras foram mapeadas em expressões algébricas e o fluxo do sistema passou a ser controlado por meio de um arcabouço algébrico. A versão algébrica da ferramenta de seleção de clones *OCI 2* (Cantão et al., 2009) está preparada para a seleção de clones em genomas procariotos parcialmente ou completamente seqüenciados, como também para projetos de metagenomas.

4.1 Regras de seleção de clones

As regras de seleção de clones estão divididas em duas versões, sendo elas: genomas parciais e completos. Em genomas parciais, para realizar a seleção dos clones, quatro regras com abordagens diferentes foram desenvolvidos. Essa divisão foi necessária, devido às diferentes situações que os clones são encontrados nos genomas parciais, sendo eles:

- Mesmo *contig* – clones localizados no mesmo *contig*;
- *Contigs* diferentes – clones localizados em *contigs* diferentes;
- *Singlet/contig* – uma das seqüências do clone localizada em *contig* e a outra como *singlet*;
- *Singlet/singlet* – ambas as seqüências dos clones fora dos *contigs*.

Nas buscas aos clones localizados nos mesmos *contigs*, somente são analisados aqueles que estão com as duas seqüências amplificadas pelos oligonucleotídeos universais presentes na região interna de um *contig*. Durante o processamento é analisado as posições iniciais e finais de todos os clones e verificam quais deles condizem com os parâmetros passados pelas regras. Em um exemplo de seleção, cuja regra seja selecionar clones que contenham 1 ORF, caso a região do clone localizado na seqüência do *contig* conter apenas 1 ORF, o clone será selecionado como ótimo, caso contrário, será descartado pela análise. Somente os clones que satisfazem a todos os atributos de seleção são considerados como ótimos (ver figura 7.1).

Nas buscas aos clones localizados em diferentes *contigs*, somente são analisados aqueles que contêm cada seqüência amplificada pelos oligonucleotídeos universais presente em diferentes *contigs*. Durante o processamento é verificado as posições iniciais de cada seqüência dos clones nos *contigs* e, ao final das análises, o clone será considerado ótimo caso as regiões representadas pelas seqüências localizadas em cada *contig* satisfaçam aos atributos passados pelas regras. Em um exemplo de seleção, cuja regra seja selecionar clones que contenham 1 ORF, cada região do clone localizado em diferentes *contigs* é analisado e, se ambas as regiões conterem 1 ORF, e as ORFs forem às mesmas, isto é, 1 ORF interrompida por um *gap* entre os *contigs*, o clone será selecionado como ótimo, caso contrário, o clone será descartado (ver Figura 7.1).

Quando a seleção ocorre aos clones que possuem uma de suas seqüências externa ao *contig*, isto é, identificada como *singlet*, o programa verifica se a região do clone interno ao *contig* e sua seqüência externa (*singlet*) satisfazem aos atributos passados para a seleção. Em

um exemplo, cuja regra seja selecionar clones que contenham 1 ORF, se as regiões dos clones localizados nos *contigs* e *singlets* conterem 1 ORF, e as ORFs forem às mesmas, isto é, ORF interrompida por um *gap* entre o *contig* e o *singlet*, o clone será selecionado como ótimo (ver Figura 7.2).

Para finalizar as regras de seleção em genomas parciais, o último processo ocorre quando ambas as seqüências dos clones estão localizadas externas aos *contigs*, nas seqüências dos *singlets*. Nesse caso, é verificado se os atributos de seleção estão presentes nas duas seqüências dos clones. Em um exemplo de seleção, cuja regra seja selecionar clones que contenham 1 ORF, no caso de ambas as seqüências amplificadas pelos oligonucleotídeos universais conterem ORFs, e as ORFs forem às mesmas, o clone será selecionado como ótimo (ver Figura 7.3).

Diferente dos genomas parciais, os genomas completos possuem todas as posições dos clones, ORF, RNAr, RNAt entre outras, já definidas na seqüência final do genoma. Contudo, o processo de seleção se equivale às condições dos clones localizados nas seqüências dos mesmos *contigs* em genomas parciais. Sendo assim, a base principal das regras usadas na seleção é o mesmo empregado nas análises dos clones localizados nos *contigs* internos em genomas parciais (ver Figura 7.4).

No intuito de exemplificar as regras de seleção de clones, são apresentadas quatro situações relevantes nos quais os clones aparecem em genomas parciais e completos e, em seguida, alguns processos de seleção aos clones ótimos são descritos.

4.1.1 Clones em genomas parciais

Nos projetos em genomas parciais, alguns fatores influenciam e dificultam o processo de seleção dos clones ótimos. Tais fatores podem ser definidos como: falta de seqüenciamento de várias regiões do genoma (*gaps*), existência de genes com seqüenciamento incompletos, clones com seqüências iniciais separadas em diferentes *contigs* ou fora deles (*singlets*), dificuldades na predição gênica devido às regiões de seqüências incompletas no genoma. Tais fatores dificultam a identificação dos clones em genomas parciais, porém, não impedem suas seleções.

4.1.1.1 Clones localizados nos mesmos *contigs*, ou *contigs* separados

O exemplo ilustrado pela Figura 7.1 apresenta duas seqüências de *contigs*, três seqüências de clones localizadas no interior de cada *contig* e três ORFs diferentes.

Figura 7.1 – Esquema das posições das ORFs e dos clones dentro dos *contigs*. No “Contig 1” e “Contig 2”, são duas ORFs inicialmente identificadas. Mesmo com um *gap* entre os dois *contigs*, identificou-se que a “ORF 2” do “Contig 2” é a mesma e continuação da “ORF 2” do “Contig 1”. O clone ótimo que seleciona a “ORF 2” é o clone *D*, enquanto que o clone ótimo que seleciona a “ORF 1” é o Clone *A*

Para o processo de seleção dos clones ótimos da Figura 7.1, as situações dos clones são descritas a seguir.

- **Clone A** – As duas seqüências amplificadas pelos óligos universais *forward* (A) e *reverse* (A’) estão localizados no “Contig 1” e a seqüência da “ORF 1” está localizada internamente ao clone. Para esse clone, sua localização no projeto é definida como: “Contig/Contig Interno”, ou pela abreviação “CCI”, isto é, clones com seqüências localizados na mesma seqüência do *contig*.
- **Clone D** – A seqüência amplificada pelo óligo *forward* (D) encontra-se no “Contig 1”, enquanto que a seqüência amplificada pelo óligo *reverse* (D’) está localizada no “Contig 2”. Mesmo com o gene não seqüenciado completamente, foi possível identificar que esse clone representa a “ORF 2”. Para esse clone em especial, sua localização no projeto é definida como “Contig/Contig Externo”, ou pela abreviação “CCE”, isto é, clones com seqüências localizados em diferentes *contigs*.
- **Clone F** – As duas seqüências amplificadas pelos óligos universais *forward* e *reverse* estão localizados no “Contig 2”. Nesse caso, a seqüência do óligo

forward (F) representa a “ORF 2”, enquanto que a sequência do óligo *reverse* (F’) representa a “ORF 3”. Portanto, esse clone contém 2 ORFs em sua sequência completa.

- **Clones B, C e E** – Esses três clones contêm apenas uma das sequências, localizada internamente aos *contigs*. Isso pode acontecer quando clones que apresentam baixa qualidade de sequenciamento não se juntam aos *contigs* durante a montagem do genoma, ou mesmo, uma das sequências pode estar localizada como *singlet*.

Com base nos clones e ORFs disponíveis para análises na Figura 7.1, três perguntas foram elaboradas para a seleção de clones e seus respectivos resultados são apresentados.

- 1) Selecionar clones que contenham a sequência de 1 ORF e localizados no mesmo *contig*.

Selecionado: *Clones A*.

- 2) Selecionar clones com 1 ORF, sequência da ORF interna ao clone e em *contigs* separados.

Selecionado: *Clone D*.

- 3) Selecionar clones que representam a “ORF 3”, localizados na mesma sequência do *contig*.

Selecionado: *Clone F*.

Das perguntas elaboradas, a primeira selecionou o clone *A*, pois é o único que contém as duas sequências do clone (B e B’) interno ao *contig* e seleciona 1 ORF. Na segunda pergunta, o clone *D* foi selecionado, pois o clone está localizado em diferentes *contigs* e internamente a sequência da “ORF 2”.

Para finalizar, a terceira pergunta é voltada para a seleção de clones que representem a “ORF 3”, não importando se o mesmo contém a sequência de outras ORFs. Desse modo, o clone identificado pela letra *F* foi selecionado como ótimo.

4.1.1.2 Clones localizados nas seqüências dos *contigs* e *singlets*

Quando o genoma se encontra em fase de seqüenciamento, o número de *contigs* montados pode chegar a milhares; o mesmo ocorre com as seqüências dos clones que ainda não estão dentro dos *contigs*, denominados *singlets*. Sendo assim, o exemplo ilustrado pela Figura 7.2 apresenta as seqüências dos clones A, A', B e C', sobrepondo e formando o “Contig 19”. A seqüência B' amplificada pelo óligo universal *reverse* do clone B está localizada externamente ao *contig* e é identificada como *singlet*.

Neste exemplo, foram identificadas 2 ORFs diferentes, sendo a “ORF 7” localizada na seqüência do “Contig 19” e a “ORF 8”, separada por um *gap* entre a seqüência do clone B' e o “Contig 19”.

Figura 7.2 – O clone B representa a “ORF 8”, sendo considerado como ótimo por conter apenas 1 ORF. Nesse exemplo, a seqüência amplificada pelo óligo *forward* do clone está localizada internamente ao “Contig 19”, enquanto que a seqüência reversa (B') aparece como *Singlet*

Com base nos clones e ORFs ilustrados na Figura 7.2, uma pergunta é elaborada para exemplificar a seleção do clone ótimo.

- 1) Selecionar clones que contêm a seqüência de 1 ORF e estejam localizados nas seqüências de *contigs* e *singlets*.

Selecionado: *Clone B*.

O clone ótimo selecionado foi o clone B, pois somente ele se encontra na situação identificada como *contigs* e *singlets* e representa a seqüência da “ORF 8”.

4.1.1.3 Clones localizados como *singlets*

A Figura 7.3 apresenta as seqüências amplificadas pelos óligos universais *forward* (A) e *reverse* (A') do clone A. Nesse caso, as duas seqüências do clone estão fora dos *contigs* e são classificadas como *singlets*. Na seqüência do clone A, foi identificada a seqüência da mesma “ORF 1” interrompida por um *gap*.

Figura 7.3 – As seqüências desse clone estão identificadas como *singlets*, pois estão fora dos *contigs* e possuem a mesma ORF identificada nas duas seqüências

Portanto, se a pergunta elaborada for para selecionar clones localizados nas seqüências dos *singlets* e que contenham 1 ORF, esse clone será selecionado como ótimo.

4.1.2 Clones em genomas completos e metagenômicos

Quando as buscas ocorrem em genomas completos, os genes já foram identificados e as posições dos clones determinados na seqüência do genoma. Dessa forma, as buscas aos clones ocorrem na seqüência final do genoma.

Sendo assim, a Figura 7.4 ilustra os clones identificados pelas letras de A a E, e a identificação de 3 ORFs, todas localizadas internamente a uma região do genoma cromossomal.

Figura 7.4 – Clones dispostos na seqüência final do genoma cromossomal

O processo que seleciona os clones nesta condição, contém as mesmas bases ao apresentado na seleção de clones ótimos em genomas parciais na condição de “*clones localizados na mesma sequência do contig*”. Porém, a diferença é que em genomas completos, as análises são realizadas apenas na sequência do genoma, enquanto que em genomas parciais, as análises são realizadas em todos os *contigs* produzidos pelo projeto.

Com base nos clones e ORFs ilustrados na região do genoma apresentado na Figura 7.4, uma pergunta é elaborada para exemplificar a seleção do clone ótimo.

1) Selecionar clones que contenha sequência de 1 ORF;

Selecionado: *Clone C*.

Neste exemplo, o clone *C* é o único selecionado, pois os demais clones *A*, *B*, *D* e *E* contém a sequência de 2 ORFs.

Capítulo 5

Implementação das ferramentas

Na primeira versão da ferramenta de seleção de clones, o controle das regras foi mapeado no código fonte da aplicação. Uma vez mapeado, as alterações para se adaptarem as novas condições de pesquisas são realizadas via código de programação. Para ganhar maior poder de expressividade e tornar as alterações das regras de seleção flexíveis, todas as regras foram mapeadas em expressões algébricas e passaram a ser controladas por meio de um arcabouço algébrico no *OCI 2*.

Para apresentar o ganho de eficiência no sistema mapeado e controlado por expressões algébricas, é realizada uma comparação entre as versões da ferramenta *OC Identifier* e *OCI 2*.

5.1 Gerenciamento do fluxo do sistema via código de programação

No controle do fluxo do sistema, realizado por meio de código de programação, todas as regras elaboradas e a ordem de suas execuções são expressas dentro do código fonte do aplicativo. Desse modo, uma vez que novas regras sejam criadas, a sua inserção implica diretamente na alteração do código do sistema.

Para demonstrar o controle do fluxo do sistema por meio de código de programação, o exemplo abaixo contém regras para selecionar clones nas seguintes condições: clones localizados em diferentes *contigs*; ORFs únicas e localizadas internamente às seqüências dos clones.

```
if (LocalizacaoCloneContig($Clone) eq "CC_E"){
  if (((NumOrfSeq($Seq1) == 1) && ((NumOrfSeq($Seq2) == 1))){
    if (SeqOrf($Seq1, $Seq2) eq "true"){
      if ((PosicaoOrf($Seq1) eq "I") && (PosicaoOrf($Seq2) eq "I")){
        print "$NomeClone";
      }
    }
  }
}
```

```
}  
  
}
```

Para esse exemplo, foram criadas quatro funções, sendo elas: *LocalizacaoCloneContig*; *NumOrfSeq*; *SeqOrf* e *PosicaoOrf*. O primeiro processamento é efetuado pela função *LocalizacaoCloneContig*, que recebe como parâmetro o nome do clone e verifica se o retorno da função é “CC_E”, isto é, seqüências dos clones localizados em diferentes *contigs*. Se o resultado da execução condicional for verdadeiro, a função *NumOrfSeq* será chamada para dar continuidade ao processamento, caso contrário a análise será finalizada.

O segundo processamento ocorre com a verificação da quantidade de ORFs localizadas nas seqüências dos clones pela função *NumOrfSeq*, e retorna o número de ORFs encontrado em cada seqüência. Sendo assim, se alguma seqüência contiver mais de 1 ORF, ou nenhuma, o processamento será encerrado, caso contrário a próxima função será chamada. A próxima análise é feita pela função *SeqOrf*, cujo objetivo é validar se as ORFs localizadas nos clones, separados por *gaps*, são as mesmas. Se o retorno da análise for o valor verdadeiro (*true*), então o clone contém 1 ORF e a próxima função será executada. Caso contrário, o clone conterá 2 ORFs diferentes e o processamento será encerrado.

O último processamento ocorre com a função *PosicaoOrf*, que verifica se o início do clone está interno (“I”) à seqüência da ORF. Se o resultado da função for verdadeiro, o nome do clone será impresso, caso contrário a execução será finalizada.

Uma vez programado o fluxo do sistema, qualquer modificação, inserção ou a remoção de novas regras, ou mesmo a alteração na ordem de execução das regras implica diretamente na reformulação do código fonte do sistema.

5.2 Gerenciamento do fluxo do sistema por linguagem algébrica

No controle do fluxo do sistema, realizado por meio de linguagem algébrica, todos os processos e a ordem de sua execução são controlados fora do código da aplicação. Dessa maneira, as mudanças implicam somente na alteração da expressão algébrica que controlam as execuções dos processos.

Com o propósito de mostrar a diferença entre o controle de fluxos dos sistemas pelo modo tradicional e pela abordagem algébrica, o mesmo processo de seleção usado na seção

anterior é mapeado em expressão algébrica e NPD. Por questão de visualização, os nomes das regras serão alterados para as letras iniciais de cada regra da seguinte maneira: a regra *LocalizacaoCloneContig* é renomeada para **LCC**; *NumOrfSeq* para **NOS**; *SeqOrf* para **SO** e por fim a Regra *PosicaoOrf* é renomeada para **PO**. Para dar continuidade à execução das regras e imprimir os clones selecionados, duas ações foram criadas, sendo elas: **GO** (*Go On*) e **PRI** (*Print*).

Considerando a lista de operadores da NPD $\{\bullet, +, ||, \%\}$, regras $\{\mathbf{LCC}, \mathbf{NOS}, \mathbf{SO}, \mathbf{PO}\}$ e as ações atômicas $\{\mathbf{GO}, \mathbf{PRI}\}$ é possível mapear o processo de seleção de clones para se comportarem da mesma forma que o exemplo apresentado na seção 5.1.

Desse modo, o processo de seleção da seção anterior é mapeado para a seguinte expressão algébrica:

```
SET Seleção1 = (%LCC ($Clone, "CC_E") GO . (%NOS ($Seq1, 1)
|| %NOS ($Seq2, 1)) GO . %SO ($Seq1, $Seq2) GO . %PO ($Seq1,
"I"; $Seq2, "I") PRI);
```

Na expressão algébrica atribuída ao processo *Seleção1*, a primeira execução ocorre com uma chamada de execução a regra **LCC** (*NumOrfSeq*), que recebe como parâmetros de entrada *\$Clone* e *CC_E* separados por vírgula, e aguarda um valor *booleano* (verdadeiro ou falso) ao final do seu processamento. Caso as seqüências dos clones estejam localizadas em diferentes *contigs*, a regra retornará um valor verdadeiro, e a ação silenciosa **GO** (*Go On*) será liberada para execução. Devido à sua definição, a ação **GO** permite dar continuidade à execução do restante da expressão. A execução seqüencial indicada pelo operador composição seqüencial ($\bullet$) passa a execução para as duas próximas regras, **NOS** (*NumOrfSeq*), na qual as execuções estão controladas pelo operador composição paralelo ($||$), e possibilita a execução das regras simultaneamente.

Ao final da execução das regras **NOS**, caso as duas seqüências do clone contenham 1 ORF, os valores retornados das regras serão verdadeiros, e, por conseguinte, a ação **GO** passará à execução adiante. Em seguida, a regra **SO** (*SeqOrf*) inicia seu processamento, analisa as seqüências das ORFs e retorna um valor verdadeiro caso as seqüências sejam as mesmas. Por fim, a ação **GO** passa adiante a execução da regra **PO** (*PosicaoOrf*), cuja função é verificar a posição das ORFs em relação aos seus clones. Nesse exemplo, caso a seqüência

da ORF esteja localizada internamente ao clone, a ação **PRI** imprimirá o nome do clone selecionado. Pelo fato de todas as regras estarem encadeadas pelo operador condicional (**•**), caso um valor falso seja retornado por alguma delas, a execução do programa é finalizado.

Uma vez que o fluxo do sistema é controlado fora do código da aplicação, o procedimento de remoção/inserção de novas regras, assim como a alteração na ordem de suas execuções, torna-se um processo totalmente dinâmico. Dessa forma, as alterações no fluxo do sistema são realizadas simplesmente recompondo a ordem da expressão algébrica para o novo conjunto de regras. No exemplo a seguir, a ordem de execução das ações **SO** e **PO** foi alterada em relação à seleção original.

```
SET Seleção1 = (%LCC ($Clone, "CC_E") GO . (%NOS ($Seq1, 1)
|| %NOS ($Seq2, 1)) GO . %PO ($Seq1, "I"; $Seq2, "I") GO .
%SO ($Seq1, $Seq2) PRI);
```

Essa nova expressão, apesar de oferecer um novo comportamento para o sistema, não demanda alteração no programa, uma vez que o *OCI 2* está preparado para executar expressões da álgebra de processos.

Por meio da álgebra de processos, é possível que as regras de seleção sejam definidas em diferentes projetos e os mesmos executados paralelamente. Desse modo, é possível determinar que os clones ótimos de um projeto sejam todos aqueles que satisfizerem as regras definidas nos processos *Seleção1* e *Seleção2*. Para isso, esse novo processo será definido da seguinte forma:

```
SET Seleção3 = (Seleção1 || Seleção2);
```

Nessa expressão, cada um dos processos pode ser executado de forma simultânea e, ao final, todos os clones selecionados serão atribuídos ao processo *Seleção3*.

Portanto, mapear o fluxo do sistema por meio de abordagem algébrica propicia maior flexibilidade ao sistema, consistência na criação de regras, precisão na geração do código gerado para controlá-las e, ainda, com a vantagem de alterar o fluxo do sistema sem implicar na reestruturação do código fonte do sistema.

5.3 Definição das regras e ações que compõem o processo de seleção dos clones no *OCI 2*

A álgebra de processos é usada no controle do fluxo de sistema no *OCI 2* e gerencia a execução de todas as regras e ações da ferramenta. Antes de descrever a expressão algébrica, primeiro será definida as regras e ações que compõem o sistema.

As regras e ações criadas para a seleção dos clones ótimos são definidas a seguir:

- **SCBT** (*SelectClonesByTarget*) – Responsável pela seleção inicial dos clones pelo tipo de Alvo. Por exemplo, gene, RNAr ou região ITS (do inglês *Internal Transcribed Spacer*).
- **SCBI** (*SelectClonesById*) – Responsável pela seleção inicial dos clones, baseada em seus identificadores (Ids). Por exemplo, o código de identificação do gene no genoma.
- **AOT** (*AnalysisOverlapTarget*) – Verifica a possibilidade de haver sobreposição de outros alvos no clone, isto é, seqüências de outros alvos no clone.
- **PCT** (*PositionCloneTarget*) – Verifica a posição do clone em relação ao seu alvo. Por exemplo, verifica se o clone está interno à seqüência do gene.
- **DCT** (*DistanceCloneTarget*) – Verifica a distância do início do clone ao início do seu alvo.
- **CT** (*CoverageTarget*) – Verifica quantas bases do clone representam a seqüência alvo.
- **PR** (*PromoterRegion*) – Verifica se um clone contém uma região promotora.
- **DOC** (*DisplayOptimalClones*) – Ação que mostra, ao final do processamento da regra, os clones que foram selecionados.
- **DOW** (*Download*) – Ação que cria um arquivo com os resultados do processamento das regras e disponibiliza para *download*.
- **GO** (*Go on*) – Ação que permite dar continuidade à avaliação da expressão algébrica.
- **END** – Ação que sinaliza o término do processo.

Uma vez que a versão do *OCI 2* é controlada por meio de linguagem algébrica, o usuário passa a se preocupar apenas com a elaboração das regras e suas ações, pois, nessa abordagem, o código que controla os fluxos do sistema é gerado automaticamente.

Desse modo, os processos de seleção dos clones ótimos são compostos por um conjunto de regras e ações atômicas. As regras podem ser definidas como as atividades que

desempenham um processamento específico e produzem como resultado um valor *Booleano* ao final da execução, enquanto as ações podem ser definidas como método que executa uma tarefa pré-estabelecida.

5.3.1 Interpretação das regras e mapeamento em álgebra de processos

A seleção de clones se baseia na presença do alvo que se pretende estudar na sequência dos clones que compõem o genoma. As regras de seleção de clones **SCBT** e **SCBI** contêm as informações para a execução do primeiro processamento dos dados. As informações básicas são expressas como atributos de entrada das regras. As regras definidas para as versões da ferramenta em genomas completos e parciais são apresentadas abaixo:

- Os parâmetros usados pelas regras **SCBT** (*SelectClonesByTarget*) e **SCBI** (*SelectClonesById*):

- **TypeGenome** – clones do genoma ('Cromossomal' ou 'Plasmidial') a ser analisado;
- **TypeTarget** – tipo do alvo a ser estudado e localizados nas sequências dos clones, sendo eles: as *ORFs* (classificadas como os possíveis genes do genoma); *rRNA* são as sequências de RNA ribossomal e *ITS* são as regiões localizadas entre duas regiões de RNA ribossomal no genoma;
- **TypeClone** – tipo do clone que contém o alvo a ser estudado, ou seja, *shotgun* ou cosmídeo;
- **OverlapOtherTarget** – indica se o clone que contém o alvo desejado possui parte de outra sequência.

- Atributos específicos da regra **SCBT**:

- **NumberTargetClone** – número de alvos para cada clone selecionado;
- **SizeTarget** – valor que restringirá o tamanho dos alvos a serem analisados;
- **FunctionCategory** – categoria funcional que restringirá as análises apenas aos genes que pertencem a uma categoria funcional em questão.

Caso os valores dos atributos não sejam informados, tais características serão ignoradas durante a seleção dos clones.

- Atributo específico da regra **SCBI**:

- **IdsTarget** – seleciona apenas os clones que contenham os alvos especificados por seus identificadores.

Atributo específico das regras **SCBI** e **SCBT** adicionadas à versão da ferramenta em genomas parciais:

- regras **SCBT** e **SCBI**:

- **LocalizationClones** – em um genoma parcial, os clones que são analisados estão localizados em uma das quatro situações, sendo elas:
 - As duas seqüências do clone (*forward* e *reverse*) localizadas no mesmo *contig*;
 - As duas seqüências do clone localizadas em *contigs* diferentes;
 - Uma seqüência do clone localizada em *contig* e a outra como *singlet*;
 - As duas seqüências do clone como *singlet*.

Definidos todos os atributos de entrada para as regras SCBT e SCBI, a seguir um exemplo de como o *OCI 2* mapeia o processo de seleção de clones de um genoma completo em álgebra de processos por meio da linguagem NPDL.

```
CREATE Rule SCBT (Cro; ORF; 1; 0; Sho; Null; Null);
CREATE Process Select1;
CREATE Action DOC, GO, END, DOW;
SET Select1 = %SCBT GO . DOC . END + %!SCBT . END;
```

Antes de definir a expressão algébrica que controlará a execução do processo, é necessário criar as ações, as regras e os processos, por meio do comando **CREATE** da linguagem NPDL. Em seguida, a expressão algébrica é atribuída a um processo pelo comando **SET**.

No exemplo do processo *Select1*, a regra SCBT foi definida para selecionar clones do tipo *Shotgun* que contenham 1 ORF na seqüência do genoma cromossomal, e que não haja

seqüência de outra ORF no clone. O tamanho da ORF e sua categoria funcional não serão usados como parâmetros discriminatórios. No final do processamento da regra SCBT (*SelectClonesByTarget*), se algum clone for selecionado, uma resposta verdadeira é retornada e habilitará a execução da ação GO (*Go on*), que dará continuidade à execução do processo que é então passada para a ação DOC (*DisplayOptimalClones*). A ação DOC mostra os clones selecionados e, em seguida, a ação END é chamada e finaliza o processo. Se na execução da regra SCBT retornar um valor falso, a ação END é executada para finalizar o processo.

Caso o processo *Select1* seja aplicado na situação ilustrada pela Figura 8, os seguintes clones seriam selecionados como ótimos:

- Clones: **A** e **C** → ORF 1;
- Clone: **D** → ORF 2;
- Clone: **G** → ORF 3.

A Figura 8 ilustra a situação em que as seqüências dos clones e cosmídeos se encontram na seqüência do genoma.

Figura 8 – Representa um genoma completo e contém as seqüências das ORFs de 1 a 3, os clones são identificados pelas letras A a H, e as seqüências dos cosmídeos identificadas pela letra C, seguida de um número, por exemplo, C1, C2. Os clones e cosmídeos são formados pelas seqüências *forward* e *reverse*, sendo que a seqüência *reverse* é identificada por apóstrofo após seus nomes, exemplo, A', D', C3'. Nem sempre as duas seqüências do clone estão presentes na montagem, como é o caso dos clones B, H e I.

- Regra SCBI

Exemplo do processo de seleção de clones pelos códigos de identificação (*Ids*) em genoma completo, mapeado em álgebra de processos.

```
CREATE Rule SCBI (Cro; ORF; Sho; 0; '1, 2 3');
CREATE Process Select2;
SET Select2 = %SCBT GO . DOC . END + %!SCBT . END;
```

Nesse segundo exemplo, apenas a regra SCBI e o processo *Select2* serão criados, pois as ações DOC, GO e END já foram criadas anteriormente. O processo *Select2* executa a regra SCBT, no qual especifica a seleção de clones do tipo *shotgun* que contenham a ORF 1, ou ORF 2 e 3, na sequência dos clones no genoma cromossomal. Porém, não será permitida a presença de bases de outra ORF no clone.

Caso o processo *Select2* seja aplicado na situação ilustrada pela Figura 8, os seguintes clones seriam selecionados como ótimos:

- Clones: **A** e **C** → ORF 1;
- Clones: **E** e **F** → ORF 2 e 3.

Após a seleção inicial dos clones, as próximas regras têm como objetivo verificar se os clones selecionados atendem as características impostas pelo processo. Desse modo, a cada atividade processada, mais refinada se tornam os resultados obtidos. A seguir, são descritas as demais regras oferecidas que compõem o processo de seleção de clones ótimos.

- Regra **AOT** (*AnalysisOverlapTargets*)

- **OverlapTarget** – um fragmento de um novo alvo (ORF, rRNA ou tRNA) que o clone poderá ter em sua sequência, além do alvo principal da busca;
- **OverlapBases** – tamanho máximo em nucleotídeos que um diferente alvo poderá estar presente na sequência do clone.

Exemplo do processo de seleção de clones mapeados em álgebra de processos:

```
CREATE Rule AOT (rRNA, 10);
CREATE Process Select3, Select3.1;
SET Select3.1 = (%AOT GO . DOC . END + %!AOT . END);
SET Select3 = %SCBT GO . Select3.1 + %!SCBT . END;
```

O exemplo acima é composto de dois processos, *Select3* e *Select3.1*, sendo que o processo *Select3*, reutiliza a mesma regra definida anteriormente para SCBT (*SelectClonesByTarget*) no processo *Select1*. O primeiro processo a ser executado é o *Select3*, e após a execução da regra SCBT se algum clone for selecionado, a ação GO libera a execução do processo *Select3.1*. Caso contrário, a ação END finalizará o processo. O processo *Select3.1* executa a regra AOT (*AnalysisOverlapTarget*), com a especificação de que, além do alvo principal (ORF), esse clone poderá ter um fragmento de, no máximo, 10 nucleotídeos de uma sequência de rRNA.

Caso o processo *Select3*, definido acima, seja aplicado na situação ilustrada pela Figura 9, os seguintes clones seriam selecionados como ótimos:

- Clones: **B e C** → ORF 4;
- Clones: **E e F** → ORF 5.

A Figura 9 ilustra uma situação em que aparece uma sequência de RNA ribossomal 5S e duas ORFs na sequência do genoma.

Figura 9 – Representa um fragmento de um genoma com duas ORFs, uma sequência de “rRNA 5S” e 8 clones identificados pelas letras A a H. O clone B encontra-se interno à “ORF 4”, enquanto que o clone F está localizado externamente à “ORF 5”. O clone E representa a “ORF 5” e contém 7 bases da sequência do “rRNA 5S” na sequência no sentido *forward*

- Regra **PCT** (*PositionCloneTarget*)

- **PositionCloneTarget** – os clones selecionados podem estar localizados “I” – dentro (*Inside*) ou “O” - fora (*Outside*) dos alvos.

Exemplo do processo de seleção de clones mapeados em álgebra de processos:

```
CREATE Rule PCT ( I );  
CREATE Process Select4, Select4.1;  
SET Select4.1 = (%PCT GO . DOC . END + %!PCT . END);  
SET Select4 = %SCBT GO . Select4.1 + %!SCBT . END;
```

Após a execução da regra SCBT no processo *Select4*, se algum clone for selecionado, a ação GO libera a execução do processo *Select4.1*, caso contrário, a ação END finalizará o processo. O processo *Select4.1* executa a regra PCT (*PositionCloneTarget*), no qual especifica que os clones obrigatoriamente estarão localizados internamente nas seqüências dos alvos.

Caso o processo *Select4*, definido acima seja aplicado na situação ilustrada pela Figura 9, o seguinte clone seria selecionado como ótimo:

- Clone: **B** → ORF 4.

- Regra **DCT** (*DistanceCloneTarget*)

- **DistanceCloneTarget** – os clones que contêm o alvo em sua seqüência iniciam a uma distância maior ou igual, ou menor ou igual (*Large or Equal* “L” ou *Less or Equal* “l”), a um determinado número de nucleotídeos dos seus alvos;
- **NumberBases** – distância que o clone tem que iniciar do seu alvo.

Exemplo do processo de seleção de clones mapeados em álgebra de processos:

```
CREATE Rule DCT (L, 15);  
CREATE Process Select5, Select5.1;  
SET Select5.1 = (%DCT GO . DOC . END + %!DCT . END);  
SET Select5 = %SCBT GO . Select5.1 + %!SCBT . END;
```

Após a execução da regra SCBT no processo *Select5*, se algum clone for selecionado, a ação GO libera a execução do processo *Select5.1*. Caso contrário, a ação END finalizará o

processo. O processo *Select5.1* executa a regra DCT (*DistanceCloneTarget*), com a definição que os clones obrigatoriamente iniciarão à distância superior a 15 bases do início do alvo.

Caso o processo *Select5* seja aplicado na situação ilustrada pela Figura 9, o seguinte clone seria selecionado como ótimo:

- Clone: **F** → ORF 5.

- Regra **CT** (*CoverageTarget*)

- **CoverageTarget** – os clones que selecionam os alvos têm que possuir uma cobertura maior ou igual ou, menor ou igual (*Large or Equal* “L” ou *Less or Equal* “I”), a um determinado número de nucleotídeos de seus alvos;
- **NumberBases** – valor máximo ou mínimo de nucleotídeos que obrigatoriamente representarão o alvo definido.

Exemplo do processo de seleção de clones mapeados em álgebra de processos:

```
CREATE Rule CT (L, 500);
CREATE Process Select6, Select6.1;
SET Select6.1 = (%CT GO . DOC . END + %!CT . END);
SET Select6 = %SCBT GO . Select6.1 + %!SCBT . END;
```

Após a execução da regra SCBT no processo *Select6*, se algum clone for selecionado, a ação GO libera a execução de *Select6.1*, caso contrário, a ação END finalizará o processo. O processo *Select6.1* executa a regra CT (*CoverageTarget*), no qual especifica que os clones obrigatoriamente terão cobertura superior a 500 bases do alvo.

Caso o processo *Select6* seja aplicado na situação ilustrada pela Figura 10, os seguintes clones seriam selecionados como ótimos:

- Clone: **B** → ORF 11;
- Clone: **D e E** → ORF 12.

A Figura 10 ilustra uma situação, na qual aparece uma região promotora e 2 ORFs na sequência do genoma.

Figura 10 – Representa um fragmento de um genoma com 2 ORFs, na região promotora da “ORF 12” e 6 clones identificados pelas letras A a F. O clone A cobre a “ORF 11” em 450 bases, enquanto que o clone B cobre a mesma ORF com 800 bases. O clone D representa a “ORF 12” por completo e inicia a 19 bases antes de sua região promotora, enquanto que o clone E representa a “ORF 12”, cobrindo 900 bases da mesma.

- Regra **PR** (*PromoterRegion*)

- **DistancePromotorRegion** – distância que o clone tem que iniciar antes de uma região promotora (região de início da transcrição dos genes).

Exemplo do processo de seleção de clones mapeados em álgebra de processos:

```
CREATE Rule PR (15);
CREATE Process Select7, Select7.1;
SET Select7.1 = (%PR GO . DOC . END + %!PR . END);
SET Select7 = %SCBT GO . Select7.1 + %!SCBT . END;
```

Após a execução da regra SCBT no processo *Select7*, se algum clone for selecionado, a ação GO libera a execução do processo *Select7.1*, caso contrário, a ação END finalizará o processo. O processo *Select7.1* executa a regra PR (*PromoterRegion*), no qual especifica que os clones obrigatoriamente têm que possuir uma região promotora e iniciar à distância superior a 15 bases do mesmo.

Caso o processo *Select7* seja aplicada na situação ilustrada pela *Figura 10*, o seguinte clone seria selecionado como ótimo:

- Clone: **D** $\rightarrow$ ORF 12.

Durante a elaboração dos processos, o usuário não precisa entender sobre álgebra de processos, NPD_L e definição das regras para criar, definir e encadear as atividades que compõem o processo de seleção de clones. Essa questão foi resolvida pelo desenvolvimento de uma interface *web* amigável, que proporciona a interação entre a ferramenta e o usuário final. Por meio de um *browser* (programa para navegador na *internet*), o usuário é capaz de fazer a combinação necessária apenas clicando e selecionando os valores desejados. Finalizada a elaboração do processo, o sistema automaticamente gera a expressão algébrica em NPD_L.

5.4 Modelagem do banco de dados do *OCI 2*

O banco de dados da ferramenta *OCI 2* foi modelado para atender diferentes tipos de projetos, sendo eles: genoma completo, genomas parciais e projetos metagenômicos. As figuras 11 e 12 apresentam os modelos conceitual/lógico e físico do banco de dados do *OCI 2*.

Figura 12 – Modelo físico do banco de dados da ferramenta *OCI 2* para genomas completos, parciais e metagenômicos

5.5 Interface do OCI 2

A ferramenta *OCI 2* foi desenvolvida para interagir com o usuário final por meio de uma interface *web*. Desse modo, o pesquisador elabora suas regras de seleção de clones sem a necessidade de saber sobre NPDL e álgebra de processos.

O *OCI 2* é baseado no conceito de álgebra de processos que, formalmente, descreve o comportamento do sistema. As expressões algébricas são criadas em NPDL que são interpretadas por meio da NavigationPlanTool (Braghetto et al., 2007). A ferramenta foi desenvolvida em linguagem Perl (<http://www.perl.org>) e armazena seus dados no banco PostgreSQL (<http://www.postgresql.org>). A Figura 13 apresenta a interface da versão da ferramenta para projetos de seleção de clones em genomas completos e metagenômicos. Por meio dessa interface, o usuário seleciona as regras que fazem parte do processo de seleção, define seus valores e cria a expressão algébrica.

OC Identifier 2
Whole genome prokaryotic - Xanthomonas Genome

Process Name Select_1		Process Description	
Genome Chromosome Xac		Target ORF	Allow Overlapping of: ☒ ORF 10 bases ☐ rRNA ☐ tRNA
Select By Target	Type Clone Shotgun	N° Targets in the Clones 1	Enter with IDs (If Selection was by Id)
Position of Clone on Target (O) outside	Size of Target (nt) Large or Equal to 400	Coverage of Target (nt) to	Distance of Sequence to Target(nt) Large or Equal to 15
Clone Having Promoter Region (PR) Dist. of PR (nt) 1	Register the clones selected Yes	ORFs belonging to Function Category	

Create Process Clear

Figura 13 – Interface da ferramenta para projeto de genoma completo de procarioto. Nessa interface, o usuário seleciona quais as atividades que farão parte da regra e define seus valores. Definida as regras, a ferramenta gera a expressão algébrica que representa fielmente o processo de seleção

A interface foi elaborada contendo as regras de seleção de clones ótimos em genomas completos e parciais definidas durante o projeto de seleção de clones no genoma parcial do *Bradyrhizobium elkanii* semia 587 (<http://lbmp.fcav.unesp.br/be587>), e ao genoma completo da

Xanthomonas axonopodis pv. *citri* (Silva et al., 2002). No exemplo de elaboração da regra e seleção de clones na Figura 13, foi usado o genoma completo e anotado da bactéria *X. axonopodis* para ilustrar a criação do processo de seleção denominado *Select_1*. Nessa seleção, os clones para serem considerados ótimos devem atender as seguintes condições:

- clones do tipo *shotgun* do genoma cromossomal que contenham 1 ORF de tamanho superior a 400 bases;
- o clone poderá conter sequência de outra ORF com, no máximo, 10 nucleotídeos, mas nenhuma sequência de rRNA e tRNA;
- clones localizados externos à ORF e iniciar à distância superior ou igual a 15 bases da mesma.

O nome do processo é definido pelo usuário e usado pela linguagem NPDL para gerar a expressão algébrica. Sendo assim, o processo denominado *Select_1*, com todas as regras e ações, é mapeado para a seguinte expressão algébrica:

```
SET Select_1 = (%SCBT (Cro; ORF; 1; 10; Sho; L,400; Null)
GO . (%AOT (rRNA, 0) GO . (%AOT (tRNA, 0) GO . (%PCT (E) GO .
(%DCT (L, 15) GO . DOW . END + %!DCT (L, 15) END) + %!PCT (E)
END) + %!AOT (tRNA, 0) END) + %!AOT (rRNA, 0) END) + %!SCBT
(Cro; ORF; 1; 10; Sho; L,400; Null) END);
```

Depois de criado o processo, o mesmo estará disponível para ser executado em uma página que contém os recursos necessários para a execução, cancelamento, edição e exclusão dos processos, como mostra a Figura 14.

The screenshot shows a web interface titled "OC Identifier 2" with the subtitle "Whole genome prokaryotic - *Xanthomonas* Genome". Below the title is a table with the following structure:

Process	Process description	Selected Clones	Edit or Delete	Execute
Select_1	Process Select_1 to Test		Edit or Delete	Execute

Below the table, there are two buttons: "Update Page" and "Back".

Figura 14 – Página responsável pela execução, cancelamento, edição e exclusão das regras elaboradas

Após a execução dos processos, os nomes dos clones selecionados estarão disponíveis para *download*, assim como o resultado do número de clones selecionados por cada regra. As páginas que elaboram e executam os processos, como também as informações detalhadas do processamento podem ser visualizadas no seguinte endereço *web* <http://tecnol86.fcav.unesp.br/Xantho>

Como apresentado anteriormente, além de genomas completos, também é possível a seleção de clones em genomas parciais. Nos genomas parciais, as regiões ainda não sequenciadas são chamadas *gaps* e as presenças nas seqüências modificam a forma como os clones serão selecionados, sendo essa a principal diferença entre a versão da ferramenta de seleção de clones em genomas completos e parciais. Para que as seleções de clones ocorram em genomas parciais, um novo atributo foi adicionado às regras iniciais (SCBT e SCBI). Esse novo atributo indica ao processo de seleção, qual a localização exata dos clones que serão analisados.

Os clones que compõem os genomas parciais se encontram em uma das seguintes situações:

- **Same Contig:** (CC_S) – clones localizados no mesmo *contig*;
- **Different Contigs:** (CC_D) – clones localizados em *contigs* diferentes;
- **Singlet and Contig:** (SC) – uma das seqüências do clone localizada em *contig* e a outra como *singlet*;
- **Singlets:** (SS) – clones fora dos *contigs*.

A Figura 15 apresenta a interface da versão da ferramenta *OCI 2* que elabora a seleção de clones em genomas parciais. Nessa interface, a seta vermelha indica o novo campo adicionado ‘*Clones Localization*’, indicado pela seta vermelha.

OC Identifier 2
Partial Genome - *Bradyrhizobium elkanii*

Process Name <input type="text" value="Select_1"/>		Process Description <input type="text"/>	
Clone Localization <input type="text" value="Different Contig"/>			
Genome <input type="text" value="Chromosome"/>	Target <input type="text" value="ORF"/>	Allow Overlapping of: ☐ ORF <input type="text"/> bases ☐ rRNA <input type="text"/> bases ☐ tRNA <input type="text"/> bases	Enter with IDs (If Selection was by Id) <input type="text"/>
Select By <input type="text" value="Target"/>	Type Clone <input type="text" value="Shotgun"/>	N° Targets in the Clones <input type="text" value="1"/>	
Position of Clone on Target <input type="text"/>	Size of Target (nt) <input type="text"/> to <input type="text"/>	Coverage of Target (nt) <input type="text" value="Large or Equal"/> to <input type="text" value="600"/>	Distance of Sequence to Target(nt) <input type="text"/> to <input type="text"/>
Clone Having Promoter Region (PR) <input type="text"/>	Register the clones selected <input type="text" value="Yes"/>	ORFs belonging to Function Category <input type="text"/>	
Create Process Clear			

Figura 15 – Interface da ferramenta no projeto de genoma parcial. Essa interface apresenta a adição da nova informação ‘*Clone Localization*’ ao processo de seleção de clones

A Figura 15 mostra o exemplo de seleção no genoma parcial da bactéria *Bradyrhizobium elkanii* Semia 587 e apresenta os parâmetros usados no processo de seleção dos clones chamado de *Select_1*. Nesse processo, os clones selecionados terão suas seqüências (*forward* e *reverse*) localizadas em diferentes *contigs*, e separados por um *gap*. Adicionalmente, os clones devem satisfazer as seguintes condições de seleção:

- clones do tipo *shotgun* do genoma cromossomal que contenham 1 ORF e que representem no mínimo, 600 bases da mesma.

Dessa forma, quando o processo *Select_1* é mapeado para NPDL gera a seguinte expressão algébrica:

```
SET Select_1 = (%SCBT (CC_D; Cro; ORF; 1; 0; Sho; Null;
Null) GO . (%AOT (rRNA, 0) GO . (%AOT (tRNA, 0) GO . (%CT (L,
600) GO . DOW . END + %!CT (L, 600) END) + %!AOT (tRNA, 0)
END) + %!AOT (rRNA, 0) END) + %!SCBT (CC_D; Cro; ORF; 1; 0;
Sho; Null; Null) END);
```

Depois de criado e executado o processo, é possível visualizar os clones selecionados, assim como o número de clones identificados para cada regra processada, como mostra a Figura 16.

OC Identifier 2
Partial genome prokaryotic - *Genome Bradyrhizobium*

Rules Applied	Clones Selected
Selection Clones by Target	144
Analysis of Overlap Target (rRNA)	144
Analysis of Overlap Target (tRNA)	144
Coverage of Target >= 600	141
Finalization Process	141

Clones Selected	IDs	Original IDs
BEJE0101H09	717	3129
BEJE0102C04	940	1016
BEJE0108H01	59	1665

Figura 16 – Visualização do número de clones selecionados por cada regra e os clones selecionados após a finalização do processo

Além de visualizar o resultado de cada processo, é possível efetuar o *download* da lista dos clones selecionados ou mesmo cancelar o processamento para eventual alteração em suas regras, como mostra a Figura 17.

<i>OC Identifier 2</i> <i>Partial genome prokaryotic - Genome Bradyrhizobium</i>				
Process	Process description	Clones Selected	Edit or Delete	Execute
Select_1	Test of Selection	141 Download		Cancel
Update Page Back				

Figura 17 – Após a execução dos processos é possível visualizar, cancelar ou fazer *download* dos resultados

As páginas que elaboram e executam os processos, como também o resultado detalhado do processamento podem ser visualizados na seguinte página *web* <http://tecnol86.fcav.unesp.br/BE>

5.6 Cadastro dos dados no sistema

Para realizar o processo de seleção é necessário que os dados sobre clones e ORFs estejam cadastrados. Os dados sobre seqüências de RNAr, RNAt, região ITS, região promotora e categorias funcionais dos genes não são obrigatórios para o processo de seleção, porém, a sua presença permite maior poder de seleção dos mesmos.

O cadastro é realizado por meio de um arquivo de texto que contém os dados delimitados por tabulações, denominado TSV (do inglês *Tab Separated Values*). O caracter *tab* é utilizado para separar os textos em cada campo e informa suas posições finais. Com o propósito de facilitar a visualização dos exemplos apresentados neste trabalho, os delimitadores *tabs* são substituídos pelo símbolo (→), o que permite a distinção visual entre dados genômicos e os delimitadores.

A seguir, são apresentadas as formatações dos arquivos de cadastro para análises em genomas completos e parciais.

5.6.1 Formatação dos arquivos em genomas completos

Para o cadastro das ORFs, RNAr e RNAt de genomas completos, adotou-se o formato PTT (do inglês *Protein Table*) do NCBI (do inglês *National Center for Biotechnology*

Information – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). O formato PTT do NCBI consiste de campos com informações para cada gene e inclui os dados de localização gênica, sentido de leitura, identificador, categoria funcional baseada no COG (do inglês *Clusters of Orthologous Groups*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG>) e função, como mostra a Figura 18.1.

Location	→	Strand	→	Length	→	PID	→	Gene	→	Synonym	→	Code	→	COG	→	Product
42..1370	→	+	→	442	→	21106039	→	dnaA	→	-	→	-	→	-	→	chromosomal replication initiator
1647..2747	→	+	→	366	→	21106040	→	dnaN	→	-	→	-	→	-	→	DNA polymerase III beta chain
3799..4905	→	+	→	368	→	21106041	→	recF	→	-	→	-	→	-	→	DNA replication and repair RecF protein
5020..7464	→	+	→	814	→	21106042	→	gyrB	→	-	→	-	→	-	→	DNA gyrase subunit B
7685..8368	→	+	→	227	→	21106043	→	-	→	-	→	-	→	-	→	conserved hypothetical protein
8552..9358	→	+	→	268	→	21106044	→	-	→	-	→	-	→	-	→	conserved hypothetical protein

Figura 18.1 – Exemplo do arquivo de cadastro das ORFs no formato *protein table*. Cada campo no arquivo é separado pelo delimitador *tab*

Os arquivos que contêm o formato *protein table* geralmente finalizam com a extensão “ptt” para os genes, “rnt” para as seqüências de RNAr e RNAt, e estão disponíveis para todos os genomas bacterianos completos em <ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes/Bacteria> (Stothard e Wishart, 2005).

Para o cadastro dos clones é necessário que o arquivo seja composto pelos seguintes campos:

- **Clone** – nome do clone;
- **Strand** – sentido do clone na seqüência do genoma. Senso (+), Anti-senso (-);
- **Start_Position**: Posição inicial do clone na seqüência do genoma;
- **End_Position** – Posição final do clone na seqüência do genoma.

Clone	→	Strand	→	Start_Position	→	End_Position
AOUT1520H01	→	+	→	2481	→	3815
AOJE01075F09	→	+	→	5301	→	7142
AOUV6708D02	→	-	→	5710	→	7461
AOAC9764G09	→	+	→	17460	→	18208
AOUV6712H09	→	+	→	4360	→	6178

Figura 18.2 – Exemplo do arquivo de cadastro dos clones que compõem o genoma

As informações sobre o tipo de clone e qual genoma os clones pertencem são definidas na página de *upload* do sistema, desse modo não é necessário adicionar no arquivo de cadastro.

A adição dos dados secundários, tais como, região promotora, região ITS e atribuir categorias funcionais aos genes seguem o mesmo processo de inclusão dos dados primários. Esse arquivo deve possuir o formato mostrado a seguir.

- Arquivo com regiões promotoras ou ITS:

- **Id_Project** – identificador da região promotora no projeto;
- **Strand** – sentido de leitura da região promotora, senso (+), Anti-senso (-);
- **Start_Position** – posição inicial da região promotora na sequência do genoma;
- **End_Position** – posição final da região promotora na sequência do genoma.

ID_Project	→ Strand	→ Start_Position	→ End_Position
XCRP0001	→ +	→ 134	→ 180
XCRP0002	→ +	→ 910	→ 980
XCRP0003	→ -	→ 2321	→ 2380
XCRP0004	→ +	→ 5340	→ 5398

Figura 18.3 – Exemplo do arquivo de cadastro das regiões promotoras ou ITS

As informações sobre o tipo da ORF, genoma e localização no genoma (clones ou *contigs*) que as sequências pertencem são definidas na página de *upload* do sistema, desse modo não é necessário adicionar no arquivo de cadastro. O campo *ID_Project* contém o código de identificação da sequência no projeto original, isto é, seu identificador no projeto de onde as sequências foram importadas.

- Arquivo de categorias funcionais:

- **First_Cat_Func** – categoria funcional primária;
- **Sec_Cat_Func** – categoria funcional secundária;
- **Function** – descrição da categoria funcional.

First_Cat_Func	→ Sec_Cat_Func	→ Function
1	→ -	→ Amino acid biosynthesis
2	→ -	→ Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups
1	→ 1	→ Aromatic amino acid family
1	→ 2	→ Aspartate family
2	→ 1	→ Biotin
2	→ 2	→ Carotenoid

Figura 18.4 – Exemplo do arquivo de cadastro das categorias funcionais

- Arquivo de atribuição às categorias funcionais aos genes:

- **Id_Project** – identificador da ORF no projeto;
- **First_Cat_Func** – código da categoria funcional primária;
- **Sec_Cat_Func** – código da categoria funcional secundária.

ID_Project	→	First_Cat_Func	→	Sec_Cat_Func
21106039	→	1	→	2
21106040	→	1	→	1
21106041	→	2	→	1
21106042	→	13	→	-
21106043	→	15	→	1

Figura 18.5 – Exemplo de arquivo de cadastro das categorias funcionais para cada ORF no genoma

5.6.2 Formação dos arquivos em genomas parciais

Em genomas parciais, as informações dos clones e ORFs aparecem de modo diferente dos projetos de genomas completos. Dessa forma, a formatação dos arquivos de cadastros também é diferente. Portanto, a seguir serão apresentados os arquivos com seus respectivos formatos para o cadastrado no banco do sistema.

- Arquivo com os dados de ORF, RNAt ou RNAr:

- **ID Project** – identificador da sequência da ORF, RNAt ou RNAr no projeto original;
- **Gene** – nome do gene;
- **Product** – descrição do gene.

ID Project	→	Gene	→	Product
1	→	-	→	anaerobic coproporphyrinogen III oxidase
2	→	-	→	3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase
3	→	-	→	biotin carboxylase subunit of acetyl-CoA
4	→	-	→	nicotinate phosphoribosyltransferase
5	→	-	→	aspartate 1-decarboxylase precursor

Figura 19.1 – Exemplo do arquivo de cadastro das ORFs presentes no genoma

- Arquivo que indica os dados das ORFs, RNAt ou RNAr que estão localizados nas sequências dos *contigs*:

- **ID_Project** – identificador da sequência da ORF, RNAt ou RNAr no projeto original;
- **Strand** – sentido da transcrição;
- **Contig** – número do *contig* em que a sequência está localizada;
- **Start_Position** – posição inicial da sequência no *contig*;
- **End_Position** – posição final da sequência no *contig*

ID_Project	→	Strand	→	Contig	→	Start_Position	→	End_Position
1	→	+	→	4480	→	12235	→	13920
2	→	+	→	4480	→	10676	→	11986
3	→	+	→	4480	→	7658	→	8101
4	→	-	→	4480	→	4800	→	5273
5	→	+	→	4480	→	5283	→	5926

Figura 19.2 – Exemplo do arquivo de cadastro das ORFs nas seqüências dos *contigs*

- Arquivo que indica os dados das ORFs, RNAt ou RNAr que estão localizadas nas seqüências dos clones:

- **ID_Project** – identificador da seqüência da ORF, RNAt ou RNAr atribuída ao projeto;
- **Strand** – sentido da transcrição;
- **Clone** – nome do clone em que a seqüência está localizada;
- **Extensao** – oligonucleotídeo universal usado na amplificação da seqüência, sendo a letra “b” para o oligonucleotídeo *forward* e “g” para *reverse*.
- **Start_Position** – posição inicial;
- **End_Position** – posição final.

ID_Project	→	Strand	→	Clone	→	Extensao	→	Start_Position	→	End_Position
43	→	-	→	BEJE0135E08	→	g	→	136	→	631
129	→	-	→	BEJE0152F03	→	g	→	63	→	734
302	→	+	→	BEJE0184A02	→	b	→	81	→	1350
308	→	-	→	BEJE0125G04	→	b	→	76	→	1838
312	→	+	→	BEJE1045D07	→	b	→	2	→	810

Figura 19.3 – Exemplo do arquivo de cadastro das ORFs nas seqüências dos clones

Além das ORFs, são cadastrados os clones que compõem o genoma. No caso de genomas parciais, as seqüências dos clones amplificados pelos oligonucleotídeos universais, podem estar localizadas em diferentes regiões do genoma e separadas por *gaps*. Nesse caso, o arquivo de cadastro dos clones contém a localização específica das seqüências.

Para isso, o arquivo de cadastrado dos clones contém os seguintes campos:

- **Clone** – nome do clone;
- **Extensao** – oligonucleotídeo usado na amplificação do clone;
- **Contig** – o numero do *contig* em que o clone se localiza;
- **Strand** – sentido do clone no contig, senso ou anti-senso;
- **Start_Position** – posição inicial do clone no *contig*;
- **End_Position** – posição final do clone no *contig*.

Clone	→	Extensao	→	Contig	→	Strand	→	Start_Position	→	End_Position
BEJE0135A01	→	b	→	1	→	+	→	1	→	710
BEJE0135A01	→	g	→	1	→	-	→	1160	→	1670
BEJE0135E08	→	b	→	1	→	+	→	30	→	600
BEJE0135E08	→	g	→	1	→	-	→	1350	→	1970
BEJE0135E10	→	b	→	-	→	-	→	-	→	-
BEJE0135E10	→	g	→	-	→	-	→	-	→	-

Figura 19.4 – Exemplo do arquivo de cadastro dos clones que compõem o genoma

- Arquivo de cadastro das regiões promotoras e região ITS:

- **ID_Project** – identificador da região promotora ou ITS recebida pelo projeto;
- **Contig** – o número do *contig* em que a região promotora ou ITS se localiza;
- **Strand** – sentido, senso ou anti-senso da região promotora ou ITS no *contig*;
- **Start_Position** – posição inicial do clone no *contig*;
- **End_Position** – posição final do clone no *contig*.

ID_Project	→	Contig	→	Strand	→	Start_Position	→	End_Position
PR001	→	12	→	+	→	20	→	89
PR002	→	15	→	-	→	1045	→	1103
PR003	→	34	→	+	→	167	→	213
PR004	→	34	→	+	→	3570	→	3660

Figura 19.5 – Exemplo do arquivo de cadastro da região promotora ou ITS nas seqüências do genoma

O arquivo de categorias funcionais e suas atribuições aos genes possuem os mesmos formatos apresentados no projeto de genomas completos. Sendo assim, tais arquivos podem ser vistos nas Figuras 18.4 e 18.5, respectivamente.

5.6.3 Página de cadastros e listagem dos dados

A página de cadastro dos dados primários e secundários, assim como os tipos de seqüências genômicas (genoma cromossomal, plasmidial, cosmidial), e os tipos de seqüências (*shotgun*, cosmídeo) são as mesmas para ambas as versões da ferramenta (genomas completos e parciais). A seguir, a Figura 20 apresenta à página de cadastros dos tipos de seqüências genômicas e a Figura 21 a página com o sistema de *upload* dos arquivos.

OC Identifier 2 - Genome sequence

List of Genome Sequences Registered

Chromosome ▾

☒ Insert New

☐ Remove Plasmideo 1 ▾

Submit

List of Type Sequences Registered

Shotgun ▾

☒ Insert New

☐ Remove Cosmideo ▾

Submit

Figura 20 – Página de cadastro dos tipos de seqüências genômicas

OC Identifier 2 - Upload System

Clones and Contigs
 Chromosome Shotgun

ORF, rRNA and tRNA
 ORF Chromosome

ITS, Promotor to Clones and Contigs
 ITS Contig Chromosome

ORF, rRNA, tRNA to Clones and Contigs
 ORF Contig Chromosome

Functional Category File
 Chromosome

ORFs - Functional Category File

Figura 21 – Página que realiza o *upload* dos arquivos para cadastramento dos dados primários e secundários ao sistema

Como apoio à consulta, uma relação com todas as seqüências de um projeto pode ser listada, como mostra a Figura 22.

OC Identifier 2 - List Orfs and Description

Whole genome prokaryotic - Genome Xanthomonas

IDs	IDs Project	Description
1	21106039	chromosomal replication initiator
2	21106040	DNA polymerase III beta chain
3	21106041	DNA replication and repair RecF protein
4	21106042	DNA gyrase subunit B
5	21106043	conserved hypothetical protein
6	21106044	conserved hypothetical protein
7	21106045	conserved hypothetical protein
8	21106047	TonB protein
9	21106048	biopolymer transport ExbB protein
10	21106049	biopolymer transport ExbD1 protein

Figura 22 – Lista das seqüências cadastradas no sistema.

5.7 Análise de desempenho do *OC Identifier* x *OCI 2*

Com a finalidade de apresentar os tempos de processamentos entre as versões da ferramenta que gerencia as regras pelo código do sistema e abordagem algébrica, foi definida uma regra de seleção e executado com diferentes números de clones cadastrados.

Para tais análises, as principais configurações de *hardware* e *software* foram às seguintes:

- Hardware

- Processador Intel *Core 2 Quad* 2.33 GHz;
- 4 GB de Memória RAM DDR2 800 MHz;
- HD SATA 500 GB 7.200 RPM.

- Software

- Sistema Operacional Linux Ubuntu 8.04 - 32 bits;
- Linguagem Perl 5.8.8;
- Banco MySQL 5.0 (usado no *OC Identifier*);
- Banco PostgreSQL 8.2.7 (usado no *OCI 2*).

5.7.1 Desempenho entre as versões OCI 1 e OCI 2

O principal objetivo da análise do tempo de processamento entre as duas versões da ferramenta é verificar se a mudança na forma de gerenciamento das regras compromete significativamente o tempo total das análises. Para isso, foi elaborada a mesma regra de seleção para ambas as versões e processadas com diferentes números de clones para cada análise.

O processo para a seleção dos clones atende as seguintes condições:

- clones contendo 1 ORF;
- localizados na mesma sequência dos *contig*;

O resultado do tempo de processamento pode ser visto na Figura 23.

Figura 23 – Tempo de processamento em relação ao número de clones presentes na consulta

As análises foram iniciadas com 7.500 clones e atingiu seu valor máximo de 33.070 clones, sendo este o número total de clones sequenciado no projeto do genoma do *B. elkanii*. Os mesmos valores foram usados nas duas versões do *softwsare* e apresentaram resultados diferentes no tempo de processamento entre eles. Com 7.500 clones, enquanto que a versão algébrica (*OCI 2*) precisou de 9 segundos para finalizar as análises, a versão da regra em código de programação do *OC Identifier* (*OCI 1*) e levou 5 segundos. Ao dobrar a quantidade

de clones no banco, o tempo de processamento do *OCI 2* passou de 9 para 16 segundos, enquanto que o *OCI 1* passou de 5 para 9 segundos.

Para finalizar as análises de tempos, o processamento foi realizado com todos os clones presentes na montagem do genoma parcial, sendo de 33.070. Nessa última análise, o *OCI 2* concluiu o processamento com 29 segundos, contra 17 segundos do *OCI 1*.

Com os tempos obtidos para cada conjunto de clones nas duas versões, fica claro que o tempo de processamento para a versão algébrica ficou em torno de 55% mais lento que a versão das regras mapeadas no código fonte do aplicativo. Mesmo a versão algébrica sendo mais lenta que a versão tradicional, o tempo total das análises não compromete o projeto, uma vez que a diferença entre as análises de todos os clones do genoma foi de poucos segundos. Quando a analisar é flexibilidade do sistema, a versão algébrica possibilita que as regras sejam completamente reformuladas e o novo código gerado automaticamente apenas alterando a expressão algébrica. Nesse sentido, em questão de segundos é possível alterar o comportamento do sistema para se adaptar as novas regras de seleção, enquanto que a alteração das regras por meio do código fonte há a necessidade de reprogramar o código para realizar tais alterações.

O uso de uma abordagem algébrica no controle do fluxo do sistema demonstrou ser viável quanto ao tempo total de execução das regras, uma vez que a pequena diferença de tempo entre as versões não comprometeu as análises dos dados.

5.7.2 Desempenho do OCI 2

No teste de desempenho realizado na versão algébrica da ferramenta, o processo de seleção foi definido para selecionar clones com 1 ORF no genoma cromossomal do genoma da *X. citri* e processado em diferentes conjuntos de clones, sendo eles, 1.000, 10.000, 100.000 e 1.000.000.

O resultado da análise do tempo de processamento pode ser visto na Figura 24.

Figura 24 – Evolução no tempo de processamento de seleção dos clones no genoma completo de *X. citri*

As análises foram iniciadas com 1.000 clones e atingiram o valor máximo de 1.000.000 clones. Com 1.000 clones, foram necessários 0,08 minutos (5 segundos) para finalizar as análises e, com 10.000, o tempo passou de 0,08 para 0,27 minutos (16 segundos). Com 100.000 clones, o tempo de processamento foi de 3,38 minutos (203 segundos), na última análise, o processamento foi realizado com 1.000.000 de clones e o tempo total necessário foi de 34,5 minutos (2.070 segundos). Levando em consideração que um cosmídeo de projetos metagenômicos varia em torno de 30 a 40 Kb, e o projeto é finalizado com o seqüenciamento de aproximadamente 1.000 clones, o tempo de consulta ao clone ótimo será de poucos segundos. Quando as análises são realizadas em projetos genomas de procaríotos, cujo são finalizados com o seqüenciamento entre 50 a 100 mil clones, a busca ao clone ótimo será finalizada em torno de 200 segundos.

Dessa forma, o tempo necessário para as buscas aos clones ótimos não é um fator limitante, pois ela pode ser realiza em um curto período de tempo. O maior desafio ainda continua sendo todo o processo que antecede a busca aos clones, tanto em questão de tempo como complexidade que são exigidas para o processo de seqüenciamento, montagem e anotação do genoma.

Capítulo 6

Resultados obtidos e conclusões

O primeiro resultado do projeto foi o desenvolvimento das regras de seleção de clones ótimos e sua implementação na ferramenta *OC identifier tool* (Cantão et al., 2007), usando a abordagem de linguagem de programação no controle e gerenciamento dos fluxos dos processos. A ferramenta *OC identifier* selecionou 2.654 clones contendo genes únicos do genoma seqüenciado, parcialmente, da bactéria *Bradyrhizobium elkanii* Semia 587 para compor um microarranjo de DNA. Esse microarranjo foi usado por Marcondes et al. (2008) nos estudos de expressão gênica da bactéria em diferentes fases de crescimento e por Pereira (2007) na comparação de genomas por CGH para análises filogenéticas.

Com a necessidade de expandir as análises, a fim de alcançar novos tipos de organismos e projetos, o sistema foi reestruturado e passou a ser controlado por meio de abordagem algébrica. Desse modo, a versão das regras mapeadas em álgebra de processos do *OC Identifier* foi implementada na ferramenta *OCI 2 – Optimal Clone Identifier based on Dynamic Rules and Process Algebra* – (Cantão et al., 2009), a qual foi empregada nas análises de dois genomas bacterianos, sendo eles: genoma completo de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, genoma parcial de *B. elkanii* e na seleção de clones em projeto metagenômico.

6.1 Resultados da seleção de clones ótimos com *OC Identifier tool*

A seleção de clones ótimos, com o uso do *OC Identifier* foi aplicada primeiramente no genoma parcial de *Bradyrhizobium elkanii* Semi 587 que continha as seguintes informações:

- 8.008 clones de *shotgun* seqüenciados;
- 3.8 milhões de nucleotídeos seqüenciados;
- 2.522 *contigs* gerados pela montagem;
- 3.374 seqüências de *singlets*;
- 3.207 ORFs, 31 RNAt; 2 RNAr.

Baseados nos dados produzidos pela montagem, dos 8.008 clones disponíveis para análises, 2.654 foram selecionados pela ferramenta *OC Identifier*, contendo genes únicos e usados na confecção de um microarranjo de DNA (Cantão et al., 2007). Esse microarranjo foi usado por Marcondes et al. (2008) nas análises dos perfis transcricionais de *B. elkanii* cultivada *in vitro* nos meios de cultura RDM (do inglês *Rhizobia Defined Medium*) e TY (do inglês *Tryptone-Yeast*), durante as fases *lag*, *log* e estacionária de crescimento, e nas análises de transcriptomas dos genes envolvidos no metabolismo de *B. elkanii* cultivada em laboratório e em simbiose com plantas de soja (*Glycine Max*), quanto ao caráter de fixação biológica do nitrogênio.

Concomitante as análises transcricionais, o mesmo microarranjo foi usado por Pereira (2007) na comparação de genomas por hibridização entre os genomas *Bradyrhizobium japonicum*, *Azorhizobium caulinodans*, *Mesorhizobium huakuii*, *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* e *Sinorhizobium meliloti*, para fins de filogenia por CGH.

O emprego das mesmas seqüências produzidas no seqüenciamento parcial do genoma do *B. elkanii*, possibilitou que três projetos com diferentes finalidades fossem desenvolvidos em um curto espaço de tempo e com menor custo. Isso foi possível, pois, as mesmas seqüências dos clones foram reutilizadas nos três projetos. Sendo assim, evitou o alto custo com a síntese de oligonucleotídeos para os as análises com microarranjo de DNA.

Com a continuidade do seqüenciamento do genoma *B. elkanii* foram adicionados 25.062 novas seqüências ao projeto. Os resultados finais da segunda montagem do genoma são as seguintes:

- 32.302 clones de *shotgun*;
- 768 pontas de cosmídeos;
- 3.795 *contigs* gerados na montagem;
- 1.155 seqüências de *singlets*;
- 5.370 *ORFs*, 54 *RNAi*; 2 *RNAr*;
- 5.1 milhões de nucleotídeos seqüenciados.

Os detalhes completos da última montagem parcial do genoma do *B. elkanii*, composta pelos novos clones, pode ser encontrado em <http://lbmp.fcav.unesp.br/be587>

6.2 Resultados da seleção de clones pelo *OCI 2* aplicado na segunda montagem parcial do *B. elkanii*

Baseado na segunda montagem parcial do genoma do *B. elkanii*, a ferramenta *OCI 2* (Cantão et al., 2009) foi reprogramada para se comportar com as mesmas variáveis de seleção projetadas no código de programação do *OC Identifier*. Sendo assim, as regras de seleção de clones contendo genes únicos, foram divididas em quatro processos diferentes e mapeadas para as seguintes expressões algébricas:

- *Select_CC_S* cada sequência amplificada pelos oligonucleotídeos universais *forward* e *reverse* estão localizados em diferentes *contigs*;
- *Select_CC_D* clones localizados nas sequências dos mesmos *contigs*;
- *Select_CS* clones localizados nas sequências dos *singlets* e *contigs*;
- *Select_SS* as sequências dos clones localizados como *singlets*.

As expressões algébricas mapeadas de cada processo, assim como os resultados de cada processamento, são apresentadas a seguir.

- Processo de seleção de clones localizados nos mesmos *contigs*

- Expressão mapeada em álgebra de processos:

```
SET Select_CC_S = (%SCBT (CC_S; Cro; ORF; 1; 0; Sho;
Null; Null) GO . DOW . END + %!SCBT (CC_S; Cro; ORF;
1; 0; Sho; Null; Null) END);
```

- Resultado obtido após o processamento

Rules Applied	Clones Selected
Selection Clones by Target	6502
Finalization Process	6502

Tabela 1 – Número de clones selecionados após a execução do processo *Select_CC_S*

- Processo de seleção de clones localizados em diferentes *contigs*

- Expressão mapeada em álgebra de processos:

```
SET Select_CC_D = (%SCBT (CC_D; Cro; ORF; 1; 0; Sho;
Null; Null) GO . DOW . END + %!SCBT (CC_D; Cro; ORF;
1; 0; Sho; Null; Null) END);
```

- Resultado obtido após o processamento

Rules Applied	Clones Selected
Selection Clones by Target	144
Finalization Process	144

Tabela 2 – Número de clones selecionados após a execução do processo *Select_CC_D*

- Processo de seleção de clones localizados em *contigs* e singlets

- Expressão mapeada em álgebra de processos:

```
SET Select_CS = (%SCBT (CS; Cro; ORF; 1; 0; Sho;
Null; Null) GO . DOW . END + %!SCBT (CS; Cro; ORF; 1;
0; Sho; Null; Null) END);
```

Rules Applied	Clones Selected
Selection Clones by Target	26
Finalization Process	26

Tabela 3 – Número de clones selecionados após a execução do processo *Select_CS*

- Processo de seleção de clones localizados como *singlets*

- Expressão mapeada em álgebra de processos:

```
SET Select_SS = (%SCBT (SS; Cro; ORF; 1; 0; Sho;
Null; Null) GO . DOW . END + %!SCBT (SS; Cro; ORF; 1;
0; Sho; Null; Null) END);
```

Rules Applied	Clones Selected
Selection Clones by Target	5
Finalization Process	5

Tabela 4 – Número de clones selecionados após a execução do processo *Select_SS*

Finalizadas as análises de todos os processos, 6.677 dos 32.302 clones de *shotgun* presentes foram selecionados contendo genes únicos. Na seleção processada pelo *OCI 2*, foi observado que, além dos 2.654 clones selecionados na primeira seleção, 4.023 clones provenientes do novo sequenciamento foram identificados como clones ótimos, isto é, clones contendo genes únicos.

O uso de clones contendo genes únicos também é possível aos projetos metagenômicos que trabalham com seqüências de cosmídeos. Assim, a mesma abordagem usada em genomas completos pode ser utilizada nos projetos de metagenomas, e os clones selecionados aplicados em experimentos biológicos sem a necessidade da síntese de oligonucleotídeos.

6.3 Resultados da seleção de clones pelo *OCI 2* aplicado no genoma completo de *X. citri*

O *OCI 2* foi testado para a seleção de clones ótimos em genomas completos. Para isso, o genoma completo e anotado da *X. citri* (Silva et al., 2002) foi analisado.

Nessa análise, os seguintes dados foram usados:

- DNA cromossomal com 5.1 milhões de bases;
- 4.313 ORFs, 54 RNAt; 6 seqüências de RNAr;
- 43.899 clones de *shotgun*;
- 2.358 pontas de cosmídeos.

Além do genoma cromossomal, a *X. citri* contém dois genomas plasmidiais, sendo eles:

- Plasmídeo XAC33
 - 33 Kb de tamanho;
 - 43 ORFs;
 - 526 clones de *shotgun*;
 - 3 pontas de cosmídeos.
- Plasmídeo XAC64
 - 64 Kb de tamanho;
 - 74 ORFs;
 - 597 clones de *shotgun*;
 - 28 pontas de cosmídeos.

O processo de seleção foi elaborado para classificar como ótimos, os clones que atendem as seguintes condições:

- clones de *shotgun* do genoma cromossomal que contenham 1 ORF de tamanho superior a 400 bases;
- o clone poderá conter sequência de outra ORF, mas de, no máximo, 10 nucleotídeos e nenhuma sequência de RNAr ou RNAt;
- localizado externo à ORF e iniciar à distância superior ou igual a 15 bases da mesma.

O processo que satisfaz a condição de seleção de clones mencionada acima é mapeado para a seguinte expressão algébrica:

```
SET Select_1 = (%SCBT (Cro; ORF; 1; 10; Sho; L,400; Null)
GO . (%AOT (rRNA, 0) GO . (%AOT (tRNA, 0) GO . (%PCT (E) GO .
(%DCT (L, 15) GO . DOW . END + %!DCT (L, 15) END) + %!PCT (E)
END) + %!AOT (tRNA, 0) END) + %!AOT (rRNA, 0) END) + %!SCBT
(Cro; ORF; 1; 10; Sho; L,400; Null) END);
```

Após a definição do processo, o mesmo estará apto a ser executado pela página *web* da aplicação. As páginas que definem e executam os processos no genoma completo da *X. citri* podem ser acessados através do seguinte endereço <http://tecnol86.fcav.unesp.br/Xantho>

Com o processamento finalizado, a Tabela 5 mostra os resultados individuais de cada regra aplicada no processo *Select_1*, em conjunto com os números de clones ótimos, selecionados ao final da execução de cada regra:

Rules Applied	Clones Selected
Selection Clones by Target	6059
Analysis of Overlap Target (rRNA)	6050
Analysis of Overlap Target (tRNA)	5998
Position of Clone Outside Target	459
Distance of Clone to Target >= 15	411
Finalization Process	411

Tabela 5 – Número de clones selecionados após a execução de cada regra no genoma completo da *X. citri*

Dos 47,411 clones usados para análises, 6.059 contêm 1 ORF em suas sequências e, portanto, foram selecionados pela primeira regra (SCBT - *SelectClonesByTarget*). A regra AOT (*AnalysisOverlapTarget*) excluiu 9 clones por apresentarem bases de RNAr e 52 clones

por apresentarem bases de RNA_t nas seqüências dos clones. Por sua vez, as regras seguintes PCT (*PositionCloneTarget*) e DCT (*DistanceCloneTarget*) foram executadas e selecionaram 459 e 411 clones, respectivamente. Assim, após avaliar todas as regras de seleção, o processo *Select_1* finalizou sua execução com 411 clones ótimos selecionados.

6.4 Resultados da seleção de clones pelo *OCI 2* aplicado em projeto metagenômico

O *OCI 2* também permite a seleção de clones ótimos em dados de projetos metagenômicos. Nessa perspectiva, o *OCI 2* foi usado para selecionar clones contendo genes de interesse no projeto metagenômico, cujo objetivo é localizar genes de biossíntese que possam ser usados como possíveis antibióticos. Para essa análise, foram usados os dados do seqüenciamento completo do cosmídeo B7P37 (Schuch et al., 2008).

Inicialmente, *OCI 2* selecionou clones contendo genes de interesse biotecnológicos para serem usados em vetores de expressão. Dessa forma, as buscas aos clones ótimos foram realizadas no cosmídeo B7P37 sob as seguintes condições:

- 1.131 clones seqüenciados;
- 30 Kb de tamanho;
- 15 ORFs identificadas.

As 15 ORFs identificadas e anotadas no cosmídeo B7P37, junto com suas funções gênicas são apresentadas a seguir.

Ids	Function
1	polyketide synthases (PKSs)
2	Efflux transporter, RND family, MFP subunit
3	ABC transporter, ATP-binding protein
4	Dehydrogenases/Redutase
5	Aspartyl/Asparaginyl beta-hydroxylase
6	9 acyl-lipid fatty acid desaturase
7	Fatty acid desaturase
8	Carbohydrate kinase
9	Uncharacterized Protein Conserved
10	Twin-arginine translocation pathway signal sequence
11	Extracellular solute-binding protein

12	Putative ABC-type uncharacterized transport system
13	Monooxygenase, FAD-binding
14	Aldo/keto reductase
15	Hypothetical protein

Tabela 6 – Códigos de identificação e funções das ORFs identificadas e anotadas do Cosmídeo B7P37

A seguir, mostra se o processo de seleção elaborado para satisfazer a seguinte pergunta biológica:

- selecionar clones que representem a ORF identificada pelo *Id 3* (função, *ABC transporter, ATP-binding protein*);
- clones localizados externos à ORF;
- iniciar a uma distância mínima de 30 bases da ORF de interesse.

Definidas as regras de seleção, o processo que controla a execução do fluxo do sistema é então criado com o nome *Select_ORF_3* e mapeado para a seguinte expressão algébrica:

```
SET Select_ORF_3 = (%SCBI (Cro; ORF; 0; Sho; '3') GO .
(%PCT (E) GO . (DCT (L, 30) GO . DOW . END + %!DCT (L, 30)
END) + %!PCT (E) END) + %!SCBI (Cro; ORF; 0; Sho; '3') END);
```

Com o processo de seleção criado, as análises são então executadas pela página do projeto localizado em <http://tecnol86.fcav.unesp.br/B7P37>. Após o processamento das regras, os resultados são apresentados a seguir:

Rules Applied	Clones Selected
Seleção de Clones por Ids	8
Position of Clone Outside Target	3
Distance of Clone to Target >= 30	2
Finalization Process	2

Tabela 7 – Número de clones selecionados após a execução de cada regra do processo *Select_ORF_3* no projeto de metagenoma

Nessa seleção, os clones ótimos são caracterizados pela presença do gene identificado pelo *Id 3*. Inicialmente, a execução da regra SCBI (*SelectClonesById*) identificou 8 clones que contêm a sequência do gene de interesse. A seguir, com a aplicação da regra PCT

(*PositionCloneTarget*), 3 clones dos 8 inicialmente selecionados contêm as ORFs internas às suas seqüências. Por fim, com a análise da regra DCT (*DistanceCloneTarget*), 1 clone foi retirado por iniciar a distância inferior as 30 bases da ORF. Ao final do processo *Select_ORF_3*, somente 2 clones foram selecionados como ótimos para representar a ORF identificada pelo *Id 3*.

Sendo assim, os 2 clones identificados como ótimos para este projeto contém o gene de interesse, e suas seqüências podem ser amplificadas e utilizadas no experimento sugerido.

6.5 Conclusão

O uso da álgebra de processos no mapeamento das regras do *OCI 2* possibilitou maior poder de expressividade e ganho de flexibilidade no controle do fluxo do sistema. Por meio de um arcabouço algébrico, todas as regras foram mapeadas em expressões da álgebra de processos e as buscas aos clones ótimos ampliadas a novos projetos de pesquisas. O uso da álgebra garantiu consistência no sistema, uma vez que as alterações passaram a ocorrer de forma dinâmica e externa ao programa, por meio da geração automática de código. Dessa forma, os pesquisadores passaram a criar e alterar suas próprias regras de seleção, independentemente de programadores.

Por meio da abordagem algébrica, foi possível estender as buscas aos clones ótimos para diferentes projetos e organismos, de modo mais rápido e seguro que as formas tradicionais. Adicionalmente, a abordagem algébrica assegurou a reutilização dos mesmos códigos a todas as regras dos projetos, excluiu redundâncias no código do aplicativo e proporcionou aumento na flexibilidade e eficiência do sistema. Com as regras de seleção mapeadas em expressões algébricas, a ferramenta selecionou clones em projetos de genoma procarioto completo e parcialmente seqüenciado. Também foi possível a seleção de clones em projeto metagenômico.

Porém, o processo de mapear as regras em expressões algébricas ainda encontra limitações na implementação da abordagem algébrica. Esse processo exige grandes esforços por parte do desenvolvedor, uma vez que é necessário criar uma interface que compila todos os dados e os convertem nas expressões em NPD. Tais limitações são poucas se comparadas ao ganho de flexibilidade que a abordagem algébrica oferece ao controle no comportamento do fluxo do sistema, assim como, na consistência durante a execução dos processos do sistema.

6.6 Trabalhos futuros

O seqüenciamento do genoma do *B. elkanii* será continuado com a adição de milhares de seqüências produzidas pela nova geração de seqüenciadores automáticos. Com as novas seqüências, em conjunto com as disponíveis no projeto, espera-se alcançar o completo seqüenciamento do genoma. Uma vez o genoma finalizado, o *OCI 2* será empregado na seleção dos clones de interesse para compor um microarranjo de genes conhecidos para os futuros projetos de transcriptomas no Laboratório de Bioquímica de Microorganismos e Plantas (LBMP).

Além das análises do genoma do *B. elkanii*, o *OCI 2* continuará a ser empregado na seleção de clones com genes de interesses biotecnológicos nos diversos projetos metagenômicos em desenvolvimento no LBMP.

Do ponto de vista computacional, a melhoria da interface com usuário, a definição da ordem da execução das regras pelo usuário, o armazenamento histórico e controle de versões dos *workflows* são desafios a serem assumidos como futuros trabalhos.

Referências Bibliográficas

- Aalst, W.M.P. van der, Hofstede, A.H.M. ter, Kiepuszewski, B., Barros, A.P.** (2003). Workflow Patterns. *Distributed and Parallel Databases*, v. 14, n. 1, p. 5-51.
- Almeida, L.G., Paixao, R., Souza, R.C., Costa, G.C., Barrientos, F.J., Santos, M.T., Almeida, D.F., Vasconcelos, A.T.** (2004). A System for Automated Bacterial Integrated Annotation-SABIA. *Bioinformatics*, 20: 2832-3.
- Bergstra, J.A., Ponse, A., Smolka, S.A.** (2001). *Handbook of process algebra*. Amsterdã: Elsevier Science Inc.
- Braghetto, K.R., Ferreira, J.E., Pu, C.** (2007). Using Control-Flow Patterns for Specifying Business Processes in Cooperative Environments. In: The 22nd Annual ACM Symposium on Applied Computing, Seoul. In: 22nd Annual ACM Symposium on Applied Computing, 2: 1234-41.
- Cantão, M.E., Araújo, L.V., Lemos, E.G.M., Ferreira, J. E.** (2009). Optimal Clone Identifier based on Dynamic Rules and Process Algebra. In: International Conference on Bioinformatics, Computational Biology, Genomics and Chemoinformatics. *International Society for Research in Science and Technology*, p. 92-99.
- Cantão, M.E., Ferreira, J.E., Lemos, E.G.M.** (2007). Optimal Clones Identifier for Genomic Shotgun Libraries: "OC Identifier tool". *Genet. Mol. Res.* 6: 743-55.
- Carraro, M.D., Kitajima, J.P.** (2002). Sequenciamento e Bioinformática de Genomas Bacterianos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. 28: 16-20.
- Cattley, S., Arthur J.W.** (2007). BioManager: the use of a bioinformatics web application as a teaching tool in undergraduate bioinformatics training. *Briefings in Bioinformatics*. 8:457-465.
- Chaisson, M.J., Pevzner P.A.** (2008). Short read fragment assembly of bacterial genomes. *Genome Res.* 18: 324-30.
- Dohm, J.C., Lottaz, C., Borodina, T., Himmelbauer, H.** (2007). SHARCGS, a fast and highly accurate short-read assembly algorithm for de novo genomic sequencing. *Genome Res.* 11:1697-706.
- Durham, A.M., Kashiwabara, A.Y., Matsunaga, F.T., Ahagon, P.H., Rainone, F., Varuzza, L., Gruber, A.** (2005). EGene: a configurable pipeline generation system for automated sequence analysis. *Bioinformatics* 12: 2812-3.

- Edwards-Ingram, L.C., Gent, M.E., Hoyle, D.C., Hayes, A., Stateva, L.I., Oliver, S.G.** (2004). Comparative Genomic Hybridization provides new insights into the molecular taxonomy of the *Saccharomyces sensu strictu* complex. *Genome Research*, 14: 1043-51.
- Ferreira, J.E., Takai, O.K., Braghetto, K.R., Pu C.** (2006). Large Scale Order Processing through Navigation Plan Concept. In: IEEE International Conference on Services Computing, Chicago, IL, USA.
- Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Bult, C.J., Tomb, J.F., Dougherty, B.A., Merrick, J.M., McKenney, K., Sutton, G., Fitzhugh, W., Fields, C., Gocyne, J.D., Scott, J., Shirley, R., Liu, Li-Ing., Glodek, A., Kelley, J.M., Weidman, J.F., Phillips, C.A., Spriggs, T., Hedblom, E., Cotton, M.D., Utterback, T.R., Hanna, M.C., Nguyen, D.T., Saudek, D.M., Brandon, R.C., Fine, L.D., Fritchman, J.L., Fuhrmann, J.L., Geoghagen, N.S.M., Gnehm, C.L., McDonald, L.A., Small, K.V., Fraser, C.M., Smith, H.O., Venter, J.C.** (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 269: 496–512.
- Fokkink, W.J.** (2000). Introduction to Process Algebra: Texts in Theoretical Computer Science. Berlin: Springer-Verlag New York, Inc., p. 163.
- Fujita, A; Massirer, K. B; Durham, A. M; Ferreira, C. E; Sogayar, M. C.** (2005). The GATO gene annotation tool for research laboratories. *Braz. j. med. biol. Res.* 38:1571-1574.
- Giuntini, E., Mengoni, A., De Filippo C., Cavalieri, D., Aubin-Horth, N., Landry, C.R., Becker, A., Bazzicalupo, M.** (2005). Large-scale genetic variation of the symbiosis-required megaplasmid pSymA revealed by comparative genomic analysis of *Sinorhizobium meliloti* natural strains. *BMC Genomics*. 6: 158.
- Goldberg S.M., Johnson J., Busam, D., Feldblyum, T., Ferriera, S., Friedman, R., Halpern, A., Khouri, H., Kravitz, S.A., Lauro, F.M., Li, K., Rogers, Y.H., Strausberg, R., Sutton, G., Tallon, L., Thomas, T., Venter, E., Frazier, M., Venter, J.C.** (2006). A Sanger/pyrosequencing hybrid approach for the generation of high-quality draft assemblies of marine microbial genomes. *Proc Natl Acad Sci.* 103: 11240-5.
- Harkins, T., Jarvie, T.** (2007) Metagenomics analysis using the genome sequencer FLX system. *Nat Methods* 4: application notes iii–v.
- Hauser, F.A., Lindemann, S., Vuilleumier, A., Patrignani, R., Schlapbach, H.M., Fischer, Hennecke, H.** (2006). Design and validation of a partial-genome microarray for transcriptional profiling of the *Bradyrhizobium japonicum* symbiotic gene region. *Mol. Genet. Genomics*. 275: 55-67.

- Hoare, C.A.R.** (1978). Communicating sequential processes. *Communications of the ACM*, 21: 666-77.
- Hollinsworth, D.** (1995). The Workflow Reference Model. Winchester: Workflow Management Coalition, p 55. (Relatório técnico, WPMC-TC00-1003).
- Huang, X., Madan, A.** (1999) CAP3: A DNA Sequence Assembly Program. *Genome Res.* 9: 868-877.
- Kim, J.S., Lim, H.K., Lee, M.H., Park, J.H., Hwang, E.C., Moon, B.J., Lee, S.W.** (2009). Production of porphyrin intermediates in *Escherichia coli* carrying soil metagenomic genes. *FEMS Microbiol Lett.* 295: 42-9.
- Koide, T., Zaini, P.A., Moreira, L.M., Vencio, R.Z., Matsukuma, A.Y., Durham, A.M., Teixeira, D.C., El-Dorry, H., Monteiro, P.B., da Silva, A.C., Verjovski-Almeida, S., da Silva, A.M., Gomes, S.L.** (2004). DNA Microarray-Based Genome Comparison of a Pathogenic and a Nonpathogenic Strain of *Xylella fastidiosa* Delineates Genes Important for Bacterial Virulence: *J Bacteriol.* 186: 5442-49.
- Letowski, J., Brousseau, R., Masson, L.** (2003). DNA microarray applications in environmental microbiology. *Analytical Letters*, 36: 3165-84.
- Li, L.-H., Li, J.-C., Lin, C.-Y., Chen, C.-Y., Tsai, S.-F.** (2004). Genomic shotgun array: a procedure linking large-scale DNA sequencing with regional transcript mapping. *Nucleic Acids Res.* 32:e27.
- Ludäscher, B., Altintas, I., Berkley, C., Higgins, D., Jaeger-Frank, E., Jones, M., Lee, E., Tao, J., Zhao, Y.** (2005). Scientific Workflow Management and the Kepler System. Concurrency and Computation: Practice & Experience, Special Issue on Scientific Workflows, to appear, 2005. <http://kepler-project.org>
- MAPA** (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). (2006). Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br>
- Marcondes, J., Cantão, M.E., Alves, L.M.C., Lemos, E.G.M.** (2008). Transcriptional profile of *Bradyrhizobium elkanii* Semia 587 in symbiosis with soybean (*Glycine max* L. Merrill) analyzed by DNA microarray. In: Felix D. Dakota; Samson B. M. Chimphango; Alex J. Valentine; Claudine Elmerich; William E. Newton. (Org). *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*. Springer, 42: 299-300.
- Meyer, F., Goesmann, A., McHardy, A.C., Bartels, D., Bekel, T., Clausen, J., Kalinowski, J., Linke, B., Rupp, O., Giegerich, R., Puhler, A.** (2003). GenDB-an open source genome annotation system for prokaryote genomes. *Nucleic Acids Res.* 31: 2187-95.

- Meyer, F., Paarmann, D., D'Souza, M., Olson, R., Glass, E.M., Kubal, M., Paczian T., Rodriguez, A., Stevens, R., Wilke, A., Wilkening, J., Edwards, R. A.** (2008). The Metagenomics RAST server - A public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics*, 9:386.
- Milner, R.A.** (1982). Calculus of Communicating Systems. Secaucus: *Springer-Verlag* New York, Inc., p. 260.
- Moreira, L.M.** (2006). Análise estrutural e funcional do genoma de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Tese de Doutorado. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, USP.
- Murata, T.** (1989). Petri Nets: Properties, Analysis and Applications. Proceedings of The IEEE, 77: 541-80.
- Nickerson, D.A., Tobe, V.O., Taylor, S.L.** (1997). PolyPhred: automating the detection and genotyping of single nucleotide substitutions using fluorescence-based resequencing. *Nucleic Acids Res.* 25: 2745-51.
- Pathak, G.P., Ehrenreich A., Losi, A., Streit, W.R., Gärtner, W.** (2009). Novel blue light-sensitive proteins from a metagenomic approach. *Environmental Microbiology*, 9: 2388-99.
- Pereira, R.M.** (2007). Filogenia de rizóbios utilizando comparação de genomas por hibridização através de Microarray. Tese Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal.
- Pierce, A.B.** (2004). Genética: Um Enfoque Conceitual. 5ª Edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan.
- Pinkel, D., Albertson, D.G.** (2005). Comparative Genomic Hybridization. (2005). *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 6: 331-54.
- Porwollik, S., Wong, R., McClelland, M.** (2002). Evolutionary genomics of Salmonella: Gene acquisitions revealed by microarray analysis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 99: 8956-61.
- Prosdocimi, F., Cerqueira, G.C., Binneck, E., Silva, A.F., Reis, A.N., Junqueira, A.C.M., Santos A.C.F., Nhani Junior, A., Wust C.I., Camargo Filho, F., Kessedjian, J.L., Petretski, J. H., Camargo L.P., Ferreira, R.G.M., Lima, R. P., Pereira, R.M., Jardim, S., Sampaio, V.S., Folgueras-flatschart, A.V.** (2002). Bioinformática: manual do usuário. *Biotecnologia ciência & desenvolvimento*. 29: 18-33.
- Overbeek, R., Larsen, N., Walunas, T., D'Souza, M., Pusch, G., Selkov, E. Jr, Liolios, K., Joukov, V., Kaznadzey, D., Anderson, I., Bhattacharyya, A., Burd, H., Gardner, W., Hanke, P., Kapatral, V., Mikhailova, N., Vasieva, O., Osterman, A., Vonstein,**

- V., Fonstein, M., Ivanova, N., Kyrpides, N.** (2003). The ERGO™ genome analysis and discovery system. *Nucleic Acids Res* 31: 164-71.
- Roach, J. C., Thorsson, V., Siegel, A.F.** (2000). Parking strategies for genome sequencing. *Genome research*. 10: 1020-30.
- Ronaghi, M.** (2001). Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res*. 11: 3-11.
- Rosa, G.J.M, Rocha, L.B., Furlan, L.R.** (2007). Estudos de expressão gênica utilizando-se microarrays: delineamento, análise, e aplicações na pesquisa zootécnica. *R. Bras. Zootec.* 36: 185-209.
- Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M.A., Barrell, B.** (2000). Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* 16: 944-5.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-7.
- Schuch, V., Alves, L.M.C., Lemos, M.V., Lemos E.G.M.** (2008) Discovery of genes related to antibiotic biosynthesis into a metagenomic library. In: 12th International Symposium on Microbial Ecology, Cairns, Australia, p.17-22.
- Scott, K.P., Martin, J.C., Campbell, G., Mayer, C., Flint, H.J.** (2006). Whole-genome transcription profiling reveals genes up-regulated by growth on fucose in the human gut bacterium *Roseburia inulinivorans*. *Journal of Bacteriology*. 188: 4340-9.
- Shah, S.P., He, D.Y., Sawkins, J.N., Druce, J.C., Quon, G., Lett, D., Zheng, G.X., Xu, T., Ouellette, B.F.** (2004). Pegasys: software for executing and integrating analyses of biological sequences. *BMC Bioinformatics* 5:40.
- Silva, A.C., Ferro, J.A., Reinach, F.C., Farah, C.S., Furlan, L.R., Quaggio, R.B., Monteiro-Vitorello, C.B., Van Sluys, M.A., Almeida, N.F., Alves, L.M., do Amaral, A.M., Bertolini, M.C., Camargo, L.E., Camarotte, G., Cannavan, F., Cardozo, J., Chambergo, F., Ciapina, L.P., Cicarelli, R.M., Coutinho, L.L., Cursino-Santos, J.R., El-Dorry, H., Faria, J.B., Ferreira, A.J., Ferreira, R.C., Ferro, M.I., Formighieri, E.F., Franco, M.C., Greggio, C.C., Gruber, A., Katsuyama, A.M., Kishi, L.T., Leite, R.P., Lemos, E.G., Lemos, M.V., Locali, E.C., Machado, M.A., Madeira, A.M., Martinez-Rossi, N.M., Martins, E.C., Meidanis, J., Menck, C.F., Miyaki, C.Y., Moon, D.H., Moreira, L.M., Novo, M.T., Okura, V.K., Oliveira, M.C., Oliveira, V.R., Pereira, H.A., Rossi, A., Sena, J.A., Silva, C., de Souza, R.F., Spinola, L.A., Takita, M.A., Tamura, R.E., Teixeira, E.C., Tezza, R.I., Trindade dos Santos, M., Truffi, D., Tsai, S.M., White, F.F., Setubal, J.C., Kitajima, J.P.**

- (2002). Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with different host specificities. *Nature* 417: 459-63.
- Stothard, P., Wishart, D.S.** (2005). Circular genome visualization and exploration using CGView. *Bioinformatics* 21: 537-39.
- Sutton, G.G., White, O., Adams, M.D., Kerlavage, A.R.** (1995). TIGR Assembler: A new tool for assembling large shotgun sequencing projects. *Genome Science and Technology*, 1: 9-19.
- Voet, D., Voet, J.G., Pratt, C.W.** (2000). Fundamentos de Bioquímica. Cap. 3, p. 54-5. Artmed Editora.
- Watanabe, T., Murata, Y., Oka, S., Iwahashi, H.** (2004). A new approach to species determination for yeast strains: DNA microarray-based comparative genomic hybridization using a yeast DNA microarray with 6000 genes. *Yeast*. 21: 351-65.
- Yeo, R.W., Wang, T., Bedzyk, L., Croker, K.M.** (2001) Applications of DNA microarrays in microbial systems. *Journal of Microbiological Methods*, 47: 257-72.