



---

# Implementación de un pipeline para el análisis de bacterias

---

Memoria para optar al título de ingeniero civil en bioinformática.

***Nombre:***

Benjamín Astudillo Alarcón

***Profesor Tutor:***

Dra. Karen Oróstica

***Profesor Encargado:***

Dra. Wendy Gonzalez

***Fecha:***

Julio, 2024

***Profesor Informante:***

Dr. José Reyes

*Esta página es dejada en blanco a propósito*

# Índice

<b>1. Introducción</b>	<b>7</b>
<b>2. Plantamiento del Problema</b>	<b>14</b>
<b>3. Objetivos</b>	<b>15</b>
3.1. Objetivo general . . . . .	15
3.2. Objetivos específicos . . . . .	15
<b>4. Estado del arte</b>	<b>16</b>
<b>5. Materiales y métodos</b>	<b>19</b>
<b>6. Resultados</b>	<b>24</b>
6.1. Búsqueda bibliográfica . . . . .	24
6.2. Identificación de los métodos de análisis . . . . .	27
6.3. Evaluación y selección de los métodos de análisis . . . . .	30
6.4. Diseño e implementación del flujo de trabajo . . . . .	32
6.5. Casos de estudio . . . . .	38
6.6. Diseño y estructura de los reportes . . . . .	42
6.7. Implementación de los reportes . . . . .	44
6.8. Documentación del flujo de trabajo . . . . .	46
6.9. Empaquetamiento del flujo de trabajo . . . . .	48
<b>7. Discusión</b>	<b>54</b>
<b>8. Conclusión</b>	<b>57</b>
<b>9. Anexos</b>	<b>58</b>
9.1. Anexo 1: Metodología para la búsqueda bibliográfica <i>elaboración propia</i> . . . . .	58
9.2. Anexo 2: Resultados del análisis taxonómico del caso de estudio <i>elaboración propia</i> . . . . .	59
9.3. Anexo 3: Resultados de la anotación funcional del caso de estudio <i>elaboración propia</i> . . . . .	60
9.4. Anexo 4: Resultados del análisis de llamado de variantes <i>elaboración propia</i> . . . . .	61

# Índice de tablas

1.	Resultados obtenidos en la revisión sistematizada ( <i>elaboración propia</i> ). . . .	26
2.	Resultados obtenidos en la identificación de métodos de análisis para el pre-procesamiento ( <i>elaboración propia</i> ). . . . .	27
3.	Resultados obtenidos en la identificación de métodos de análisis para el proceso de ensamble o alineamiento ( <i>elaboración propia</i> ). . . . .	27
4.	Resultados obtenidos en la identificación de métodos de análisis para el control de calidad ( <i>elaboración propia</i> ). . . . .	28
5.	Resultados obtenidos en la identificación de métodos de análisis para la identificación taxonómica ( <i>elaboración propia</i> ). . . . .	29
6.	Resultados obtenidos en la identificación de métodos de análisis para la identificación de genes de resistencia antibiótica ( <i>elaboración propia</i> ). . . . .	29
7.	Resultados obtenidos en la identificación de métodos de análisis para la anotación funcional ( <i>elaboración propia</i> ). . . . .	30
8.	Estrategía utilizada para la implementación de los reportes con sus respectivas acciones ( <i>elaboración propia</i> ). . . . .	45
9.	Información sobre las herramientas instaladas dentro de la imagen docker ( <i>elaboración propia</i> ). . . . .	49
10.	Información de cobertura, lecturas, puntos de ruptura, y taxonomía ( <i>elaboración propia</i> ). . . . .	59
11.	Resultados de la anotación funcional ( <i>elaboración propia</i> ). . . . .	60
12.	Resultados del análisis de llamado de variantes ( <i>elaboración propia</i> ). . . . .	61

## Índice de figuras

1.	Etapas de la metodología ( <i>elaboración propia</i> ). . . . .	19
2.	Diseño de las etapas del flujo de trabajo ( <i>elaboración propia</i> ). . . . .	21
3.	Selección de herramientas y definición de los procesos del flujo de trabajo ( <i>elaboración propia</i> ). . . . .	31
4.	Diseño del flujo de trabajo ( <i>elaboración propia</i> ). . . . .	32
5.	Estructura del repositorio de trabajo. . . . .	46
6.	Metodología utilizada en la búsqueda bibliográfica ( <i>elaboración propia</i> ). . . .	58

## Resumen

La bioinformática es un campo de la ciencia en el cual confluyen varias disciplinas: biología, computación y tecnología de la información. Esta definición procede del NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica de EUA) y tiene como objetivo crear bases de datos públicas de libre acceso, crear investigación en biología computacional, desarrollar programas para análisis de secuencias y difundir la información biomédica.

En la actualidad se disponen de varias bases de datos con información biológica; los investigadores pueden acceder a los datos existentes y suministrar o revisar datos, así como utilizar la información para realizar análisis comparativos entre secuencias de nucleótidos y aminoácidos. En el campo de la resistencia bacteriana, la bioinformática se emplea para la asignación funcional de genes por medio de comparaciones con secuencias (ADN o proteínas) previamente existentes en el GenBank. En este mismo sentido y debido al aumento de enfermedades provocadas por agentes patógenos infecciosos, se hace imprescindible continuar investigando las bacterias para identificar características que puedan mejorar la resistencia o la calidad de los antibióticos, así como las terapias génicas.

En razón de lo anterior, es que este trabajo tiene como propósito desarrollar un Pipeline Bioinformático que integre herramientas computacionales necesarias para el procesamiento y análisis genómico de bacterias, que establezca un flujo predefinido que permita automatizar el proceso, haciendo que cada etapa del trabajo sea visible, facilitando de esta manera, el control sobre el avance de la tarea, sin necesidad de un aumento de los recursos, disminuyendo además, la posibilidad de errores y propiciando una evolución constante, que permita mayor y mejor accesibilidad a otros investigadores.

Para este efecto, se priorizaron métodos de análisis genómicos y se automatizó un reporte final, además de estructurar la implementación y empaquetamiento del pipeline.

Se pretende que el pipeline sea utilizado por investigadores y profesionales no especializados en bioinformática, mejorando así la accesibilidad y reproducibilidad de los análisis genómicos. Así también, permitirá integrar el pipeline con otras herramientas y base de datos relevantes, facilitando la interoperabilidad y la reutilización en proyectos futuros.

***Palabras claves: pipeline, anotación, bioinformática, secuenciación, resistencia bacteriana, datos genómicos.***

# 1. Introducción

Se considera genoma a toda la información biológica que tiene un organismo. La mayoría de los genomas, incluyendo el ser humano y toda forma de vida celular, está compuesto por la totalidad de ADN [1], que se encuentra en una célula, ya sea en los cromosomas o en organelos llamados mitocondrias. Por ejemplo, si se habla del genoma humano, este se refiere a la totalidad de ADN presente en una célula reproductiva normal. Así pues, en los últimos años, se ha perfeccionado la tecnología para obtener la secuencia completa de ADN de una especie de una forma rápida y eficiente. Por tanto, actualmente es posible saber el genoma de muchos organismos vivos [1].

Así mismo y a través de técnicas de análisis genómico, se logra caracterizar bacterias, permitiendo entender cómo funcionan y qué papel desempeñan en diferentes contextos biológicos. Igualmente, los diferentes tipos de análisis genómicos varían dependiendo del objetivo de cada investigación. Sin embargo, para poder comenzar cualquier tipo de caracterización, es crucial disponer de datos de secuenciación del genoma completo (*WGS*). El ensamblaje del genoma, a partir de estos datos, es un paso fundamental en este proceso, ya que proporciona una representación coherente y completa del genoma bacteriano. Este ensamblaje permite realizar análisis más precisos y detallados, como la anotación de genes, la identificación de regiones funcionales, la comparación con otros genomas y detección de ARG [2].

En definitiva, el ensamblaje bacteriano, implica un preprocesamiento de las lecturas, un montaje de las lecturas y en varios casos un paso adicional de pulido el montaje. En este sentido, lograr desarrollar un ensamblaje de calidad, significa que se deben generar contigs (*fragmentos continuos de secuencia*) con pocos espacios restantes, baja tasa de error, entre otros. Es decir, la generación de un buen rendimiento depende totalmente de las herramientas y parámetros utilizados en las plataformas de secuenciación [2].

En resumen, una vez que se tiene el montaje realizado, se pueden hacer los análisis respectivos, ya sea para la identificación de las funciones biológicas, procesos celulares, o ontología genética entre otros [3]. Para realizar los análisis es necesario la utilización de diversas herramientas bioinformáticas o recurrir a flujos de trabajo computacionales, con herramientas y recursos específicos que ayuden o faciliten el proceso [2].

En suma, será cada vez más común acceder a grandes bancos de información genómica, utilizar algoritmos sofisticados y realizar análisis de datos desde nuestras terminales perso-

nales, sin tener que generar nuestra propia infraestructura informática o contar con el apoyo de expertos en informática. Es así como, la investigación biológica que utiliza información genómica se convierte cada vez más en una actividad computacional, analizando cantidades gigantescas de datos desde la comodidad de nuestras computadoras personales [4].

## Desafíos del Análisis de Big Data en Genómica Bacteriana

Cuando hablamos de Big Data nos referimos a conjuntos de datos o combinaciones de conjuntos de datos cuyo tamaño (*volumen*), complejidad (*variabilidad*) y velocidad de crecimiento dificultan su gestión, procesamiento o análisis mediante tecnologías y herramientas convencionales, tales como bases de datos relacionales y estadísticas convencionales o paquetes de visualización, dentro del tiempo necesario para que sean útiles [5].

Por otra parte, la genómica se encarga de determinar y analizar la secuencia completa de ADN de un organismo, es decir, de un genoma. Por lo tanto, es el estudio de la totalidad de los genes de un organismo para comprender su organización, función, interacción y evolución molecular [1]. En cuanto a los desafíos que plantea el análisis de Big Data en la genómica bacteriana, podemos señalar que el avance de la secuenciación de alto rendimiento o nueva generación [6], permite obtener una rebaja en los costos de rendimiento y un gran aumento en el tamaño de los datos de secuenciación generados, permitiendo una mejor claridad de la taxonomía y una mejor capacidad para evaluar las diferentes capacidades del sistema secuenciado [7].

Todo lo anterior, significa que cada vez tenemos una cantidad mayor de datos, lo que nos lleva a utilizar técnicas y tecnologías de big data, data mining y data science para procesarlos y extraer información útil de ellos [4].

## Herramientas y experiencias de desarrollo en tareas de procesamiento y gestión de datos en bioinformática

El aumento en el poder de procesamiento y sofisticación de las herramientas y técnicas analíticas ha dado como resultado para la gestión y procesamiento de datos, la creación de estructuras y programas que proporcionan almacenamiento, funcionalidad y receptividad a las consultas, que van más allá de las bases de datos destinadas a transacciones. El área de bioinformática, en este sentido, enfoca parte de su trabajo en el procesamiento de datos,



donde se requieren herramientas con suficiente flexibilidad con el fin de dar soporte a las tareas propias del manejo de formatos de almacenamiento y métodos de procesamiento, reduciendo de esta manera, la dimensionalidad del espacio de trabajo [8].

## Comandos Unix

Los comandos Unix corresponden a pequeños programas que se pueden ejecutar de varias formas, entre ellas, de forma interactiva desde una terminal. Gran parte de los servidores están basados en sistemas Unix, como Solaris, BSD, HP-UX, así como las distintas distribuciones de Linux que también son muy utilizadas en el ámbito personal, entre ellas Ubuntu, Debian, CentOS, Red Hat, etc. También MacOS está basado en Unix [9].

Estos programas se pueden encontrar al introducir un comando en una terminal, el intérprete de comandos lo busca en directorios incluidos en lo que se denomina PATH. El PATH es una variable de entorno que contiene una lista con los directorios del sistema más comunes para almacenar ejecutables, por ejemplo `/bin` o `/usr/bin`. Para ver los directorios que contiene el PATH, podemos ejecutar el comando `echo $PATH`. Si se ejecuta un comando que el sistema no encuentra, es debido a que no está en ninguno de estos directorios [9].

En sistemas de tipo Unix, es bastante común usar la terminal para moverse de un lado a otro y realizar las acciones desde allí, en lugar de usar un explorador de archivos o cualquier otro programa con interfaz gráfica [9].

## Bash Scripting

Un Bash Shell Script corresponde a un archivo de texto sin formato que contiene un conjunto de varios comandos que normalmente escribimos en la línea de comandos. Se utiliza para automatizar tareas repetitivas en el sistema de archivos Linux. Puede incluir un conjunto de comandos, o un solo comando, o puede contener las características de la programación imperativa como bucles, funciones, construcciones condicionales, etc. Efectivamente, un script Bash es un programa de computadora escrito en el lenguaje de programación Bash [10].

Bash, es un procesador de comandos que generalmente se ejecuta en una ventana de texto, donde el usuario escribe comandos que causan acciones. Bash también puede leer y ejecutar comandos desde un archivo, llamado script de shell. Conocer los comandos y el manejo de

scripts en Bash es esencial para llevar a cabo multitud de tareas bioinformáticas, el hecho de que nos permite realizar scripts que operan directamente sobre comandos del sistema, nos permitirá automatizar tareas, ahorrando mucho tiempo y esfuerzo [11].

## Pipeless y Pipeline

Un pipeless puede considerarse como un agente autónomo, experto en la realización de una tarea específica; recibe una o más entradas que pueden provenir del propio usuario o de otros pipeless [8].

Por otra parte, los pipelines constituyen una conexión secuencial de pipeless, y la salida de un pipeless corresponderá a la entrada del siguiente. El pipeless de inicio puede contener varias entradas. La estrategia de pipelines expone una solución que permite desencadenar una serie de procesos controlados, realizando incluso pasos intermedios de formateo de datos según los requerimientos de cada pipeless en particular; esto optimiza tanto el uso de recursos informáticos como el tiempo, disminuyendo críticamente el tiempo muerto entre ejecución y ejecución [8].

Entre las experiencias de uso de pipelines se pueden mencionar trabajos relacionados con la comparación fenotípica, que incorpora la selección de propiedades y la distribución y estadística asociada a variables asociadas a la selección, además de la categorización y comparación final. Otro ejemplo de uso se asocia a la caracterización de funciones en un contexto evolutivo, donde se producen selecciones de secuencias, visualización y análisis de estructuras secundarias, identificación de interacciones sistémicas, análisis y visualización de resultados y por último la selección de datos [8].

En resumen, la estrategia de pipelines en distintos proyectos permite abordar de forma efectiva el sistema de gestión de datos, generando una nueva forma de abordaje a problemas complejos, especialmente en lo relacionado a la genómica comparativa. Cabe mencionar, que la creación de nuevos pipelines estará limitada sólo por la capacidad del usuario para generar flujos de trabajo adecuados que permitan su ejecución.

## Flujo de trabajo con Nextflow

Este texto, nos lleva a entender cómo los avances experimentados por las tecnologías de secuenciación han desembocado en un mayor número de experimentos ómicos (*nuevos campos*

*de investigación*) que requieren de análisis reproducibles de cantidades ingentes de datos. En este sentido, las primeras aproximaciones de herramientas bioinformáticas —*pipelines*—, que se desarrollaron para este cometido, sufren de inestabilidad numérica (*numerical instability*) cuando el mismo pipeline se usa en diferentes plataformas, de forma que se imposibilita la reproducibilidad de los trabajos [12].

De acuerdo a lo anterior, Nextflow nace como lenguaje para la construcción de pipelines mejorando el uso de los recursos informáticos, controlando el flujo de datos de entrada y salida y manteniendo un registro de todas las actividades desarrolladas al fin de poder seguir el flujo de trabajo mismo, corregir errores eventuales y mantener un registro de los comandos ejecutados. Esta herramienta constituye un sistema de gestión de flujos de trabajo que utiliza distintas infraestructuras informáticas como Docker, Conda, Singularity, etc. para el manejo a gran escala mediante el uso de los que se conocen como “contenedores”. Estos últimos son entornos de computación configurados de tal forma que solamente admiten las entradas y salidas de datos para lo que se han desarrollado [12]. Las características que hacen de Nextflow una herramienta útil y flexible para la creación de pipelines son la posibilidad integración en repositorios de software como BitBucket, cuya página web se corresponde con la dirección <https://bitbucket.org/> o GitHub, <https://github.com/>, un soporte nativo para sistemas en la nube. Además, se basa en el uso de contenedores multiescala, y de la paralelización de los procesos que se conectan mediante canales. Todas estas características mejoran la reproducibilidad computacional y posicionan a Nextflow como un lenguaje de dominio específico que adelanta a sus competidores.

Un pipeline implementado en Nextflow puede contener cualquier lenguaje — incluso varios diferentes — compatible con Linux, como Python o Perl. Los procesos dentro de dicho pipeline estarían conectados mediante canales o colas FIFO asíncronas, ejecutándose en paralelo e independientemente cuando el input que requieren esté disponible. Un mismo proceso puede tener varios inputs y outputs, y diferentes procesos pueden tener un mismo input que llega a través de canales diferentes. En Nextflow se encuentran dos tipos distintos de canales: — Canal de colas (*queue channel*): cola FIFO no bloqueante y unidireccional. Este tipo de canal conecta dos procesos, es decir, el canal solo se puede usar una única vez como salida y solo una vez como entrada. En el caso de necesitar que se conecten varios procesos es posible duplicar — triplicar, cuadruplicar, ... — un canal de colas mediante el operador `into`. — Canal de valores (*value channel*) o canal singleton: canal que contiene un solo valor, por lo

que se puede emplear ilimitadamente como input sin ser consumido [12].

Por otro lado, Nextflow crea directorios únicos y temporales para cada proceso del pipeline, lo que implica que no es necesario organizar los outputs y facilita la gestión de estos, ya que no se requiere una estructura de directorios organizada o nombrar los archivos de forma estática para su identificación inequívoca. Más aún, en cada proceso no es imprescindible nombrar cada archivo de salida, pues al existir directorios únicos para cada proceso, no se produce la superposición entre archivos. También, es posible relacionar los outputs con metadatos mediante el operador tuple para evitar incluirlos en el nombre del archivo de salida [12].

## Contenerización

El procedimiento de contenerización se ha convertido en la última palabra en cuanto a informática en la nube, Es más eficiente que la virtualización, y es su evolución natural. Mientras que la virtualización es vital para distribuir varios sistemas operativos (*SO*) en un único servidor, la contenerización es más flexible y granular. Se centra en dividir los sistemas operativos en fragmentos que pueden utilizarse de manera más eficiente. Además, un contenedor de aplicaciones proporciona una forma de empaquetar aplicaciones en un entorno portátil definido por software [13].

Es una forma de virtualización del SO en la que se ejecutan aplicaciones en espacios de usuario aislados llamados contenedores, que utilizan el mismo SO compartido. Un contenedor de aplicaciones es un entorno informático portátil y totalmente empaquetado:

- Tiene todo lo que una aplicación necesita ejecutar, incluidos sus binarios, bibliotecas, dependencias y archivos de configuración, todo encapsulado y aislado en un contenedor.
- La contenerización de una aplicación abstrae el contenedor del sistema operativo host, y proporciona acceso limitado a los recursos subyacentes, un proceso similar al de una máquina virtual ligera.
- Puede ejecutar la aplicación en contenedores en varios tipos de infraestructuras, como en estructuras físicas, en la nube o dentro de máquinas virtuales, sin tener que refactorizar para cada entorno [13].

Aunque los conceptos de contenerización y aislamiento de procesos tienen décadas de antigüedad, la aparición de un motor de Docker de código abierto en 2013 aceleró la adopción

de la tecnología de contenedores de aplicaciones. El motor de Docker se convirtió en un estándar de la industria para el proceso de contenerización con un enfoque de empaquetado universal y herramientas de desarrollo simples [13].

## Motor de Docker

Docker es una plataforma de código abierto que permite a los desarrolladores crear, desplegar, ejecutar y gestionar contenedores, que son componentes estandarizados y ejecutables que combinan el código fuente de aplicación con las dependencias y las bibliotecas del sistema operativo (SO) necesarias para ejecutar dicho código en cualquier entorno [14].

Los contenedores simplifican el desarrollo y la entrega de aplicaciones distribuidas y han ido ganando popularidad con la transición de las organizaciones hacia entornos híbridos multi nube y de desarrollo nativo en la nube. Los desarrolladores pueden crear contenedores sin Docker trabajando directamente con las funciones integradas en Linux y otros sistemas operativos, pero la contenerización que realiza Docker es más rápida, más fácil y más segura [14].

La tecnología Docker utiliza el kernel de Linux y sus funciones, como los grupos de control y los espacios de nombre, para dividir los procesos y ejecutarlos de manera independiente. El propósito de los contenedores es ejecutar varios procesos y aplicaciones por separado para que se pueda aprovechar mejor la infraestructura y, al mismo tiempo, conservar la seguridad que se obtendría con los sistemas individuales [15]. Las herramientas de los contenedores, como Docker, proporcionan un modelo de implementación basado en imágenes. Esto permite compartir fácilmente una aplicación o un conjunto de servicios, con todas las dependencias en varios entornos. Docker también automatiza la implementación de las aplicaciones (*o los conjuntos de procesos que las constituyen*) en el entorno de contenedores [15].

Estas herramientas están diseñadas a partir de los contenedores de Linux, por eso la tecnología Docker es sencilla y única. Además, ofrecen a los usuarios acceso sin precedentes a las aplicaciones, la posibilidad de realizar implementaciones en poco tiempo y el control sobre las versiones y su distribución [15].

## 2. Plantamiento del Problema

El rápido avance de la secuenciación de genomas bacterianos, ha llevado a una acumulación masiva de datos genómicos que requieren análisis profundos que permitan comprender la diversidad, evolución y funcionalidad de estos microorganismos. Sin embargo, el acceso a herramientas de análisis adecuadas y la interpretación de los resultados siguen siendo un desafío para muchos científicos del área, especialmente en lo que respecta a la reproducibilidad y escalabilidad de los flujos de trabajo bioinformáticos. Se hace imprescindible entonces, disponer de un flujo predefinido, que permita automatizar el proceso, haciendo que cada etapa del trabajo sea visible, facilitando de esta manera, el control sobre el avance de la tarea. sin necesidad de un aumento de los recursos, disminuyendo la posibilidad de errores y propiciando una evolución constante que permita mayor y mejor accesibilidad a otros investigadores.

## **3. Objetivos**

### **3.1. Objetivo general**

Desarrollar un Pipeline Bioinformático que integre herramientas computacionales necesarias para el procesamiento y análisis genómico de bacterias novedales con potencial biotecnológico, permitiendo de esta manera la generación de reportes automatizados.

### **3.2. Objetivos específicos**

1. Priorizar los métodos de análisis genómico y anotación funcional principales para la exploración de bacterias novedales con potencial biotecnológico.
2. Desarrollar un pipeline bioinformático basado en la caracterización de necesidades de análisis genómicos previos.
3. Definir estructura del reporte Automatizar la generación de reportes de resultados de secuenciación y de anotación funcional a partir de datos genómicos.

## 4. Estado del arte

En este capítulo se plantea una revisión del estado del arte en relación a los flujos bioinformáticos existentes, que permiten mayor eficiencia en el análisis de la genómica bacteriana.

De acuerdo a lo anterior, se presentan algunas experiencias vinculadas a flujos de trabajo, con respecto a la obtención de información metagenómica.

Este capítulo permitirá visualizar enfoques metagenómicos aplicados a distintas investigaciones, flujos bioinformáticos que permiten la aplicación de pipelines asociados a la información que se obtiene de las etapas de cada investigación.

### **Metagenomic and network analysis revealed wide distribution of antibiotic resistance genes in monkey gut microbiota**

Este artículo tiene como objetivo utilizar el enfoque metagenómico, para descubrir la comunidad bacteriana en el mono NHP - cynomolgus. Se busca identificar diferentes genes de resistencia antibiótica, explorar la relación entre las bacterias, para identificar posibles riesgos para la salud, a partir de las heces del mono.

Los autores mencionan, el flujo de trabajo realizado posterior a la recopilación de datos, para realizar un análisis bioinformático. Se realizó en primer lugar un análisis, a través de la herramienta MetaPhlAn2, y una visualización del árbol taxonómico utilizando GrapPhlAn. Además, se explica detalladamente cómo se generó un modelo de aprendizaje automático utilizando el algoritmo RF (*bosque aleatorio*) en Python. En el caso de la anotación funcional de genes de resistencia antibiótica, se explica que para realizar la anotación de todas las proteínas identificadas, se realizó una búsqueda de similitud de secuencia con la herramienta Diamond Blastp, usando la base de datos ARGminer. Los últimos análisis corresponden a análisis estadísticos y de redes usando la plataforma R versión 3.5.1. De esta manera, se evaluó las diferencias en la abundancia de genes de resistencia antibiótica entre diferentes grupos de tratamiento dietético, se realizaron visualizaciones de las relaciones entre las muestras de cada grupo de monos cynomolgus y una visualización aluvial para comprender cómo los genes se distribuyen.

Finalmente, con el objetivo de revelar cuáles son las diferencias entre los genes de NHP y de humanos como una red, para obtener más información sobre la obesidad, diabetes tipo II



y diferentes enfermedades coronarias en el humano debido a la similitud con el ser humano.

## **Overview of bioinformatic methods for analysis of antibiotic resistance from genome and metagenome data**

Este artículo menciona los diferentes flujos de trabajo bioinformáticos que se realizan para el análisis de resistencia antibiótica ya sea a partir de un genoma o de información metagenómica. De esta manera, se expone la importancia que tiene el secuenciar genomas completos, y el que tan necesario es poder analizar los datos, recurriendo a flujos de trabajo bioinformáticos. Cada flujo de trabajo, posee diferentes herramientas y recursos específicos que ayudan al análisis. Dentro de los flujos de trabajo, el primero describe el pre procesamiento y ensamblaje de las lecturas de datos de WGS destacando la importancia que tiene la calidad de las lecturas. Dentro de este flujo se habla sobre omitir el paso del ensamblaje con el fin de acelerar el proceso computacional en bacterias monomórficas. En otros casos, van desde la identificación taxonómica a nivel de especie, nivel de mutación y de cepa.

## **LGAAP: Leishmaniinae Genome Assembly and Annotation Pipeline**

Este artículo describe un proceso computacional para el ensamblaje y anotación de genomas de un tamaño aproximado de 35 mb. El autor, menciona qué parámetros utilizan, en qué orden fueron ejecutados las herramientas y qué datos fueron analizados. De esta manera, se utilizaron 6 genomas de la subfamilia del parásito Leishmaniinae, que presentaba lecturas cortas, y largas. Además se describe cuales son los archivos de salida, que son el ensamblaje a escala de cromosomas, las proteínas y transcripciones en formato FASTA, dos archivos GFF, uno con las características y otro con las coordenadas.

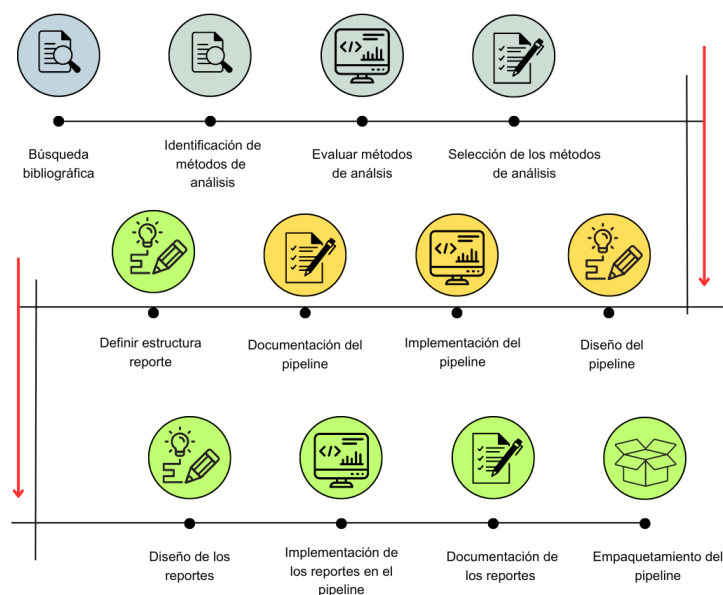
## **A Pipeline for Non-model Organisms for de novo Transcriptome Assembly, Annotation, and Gene Ontology Analysis Using Open Tools: Case Study with Scots Pine**

Esta publicación describe el flujo bioinformático utilizado para el ensamblaje del transcriptoma, la anotación y el análisis de ontología genética del pino silvestre *Pinus Sylvestris*.

El procedimiento descrito muestra un requisito básico de conocimientos en bioinformática y línea de comandos linux. De esta manera, el autor realiza un análisis que describe y clasifica los genes y productos génicos de acuerdo a su función molecular, implicación en los procesos biológicos y localización celular.

## 5. Materiales y métodos

En este capítulo se presenta el enfoque metodológico de esta investigación. Se establece el conjunto de herramientas y las diferentes etapas que permitirán el avance de este trabajo.



**Figura 1:** Etapas de la metodología (*elaboración propia*).

### Búsqueda bibliográfica

La primera etapa del capítulo asociado a los materiales y métodos, corresponde a la búsqueda bibliográfica. Esta investigación documental persigue conseguir respuestas a partir de diferentes publicaciones, artículos e información existente en distintas bases de datos, en particular desde Pubmed. Todo este trabajo se realiza utilizando distintos filtros de búsqueda, términos y descriptores para obtener información con mayor exactitud.

Para enfocar y delimitarla en razón del trabajo de tesis, se procede al planteamiento de algunas preguntas claves tales como:

- ¿Cuáles son los flujos de trabajo bioinformáticos?.

- ¿Qué herramientas y pipelines se recomiendan?.
- ¿Qué publicaciones describen pipelines?.
- ¿Cuáles son las mejores prácticas para diseñar y ejecutar?.
- ¿Cómo se integran las herramientas?.

Las preguntas, además de guiar la búsqueda, permiten definir la estrategia siguiente, en cuanto a la forma y selección de terminología.

## **Identificación de métodos de análisis**

La búsqueda bibliográfica, asociada a distintas experiencias de flujos de trabajo vinculados con la genómica, nos conducirá a establecer diferentes contextos en que se utilizan herramientas bioinformáticas. La recopilación de estas herramientas, permitirá caracterizarlas y definir en qué método de análisis serán utilizadas. Una vez asignadas las herramientas al método correspondiente, se evaluará su complementariedad y funcionalidad con el resto de las herramientas.

## **Evaluación y selección de métodos de análisis**

La evaluación de las herramientas y su selección se realizará en base a su adaptabilidad en el mismo sistema de ejecución y a la complementariedad con el resto de las herramientas, es decir, se considerarán las características comunes en sus dependencias, además de la facilidad de comunicación de sus entradas y salidas.

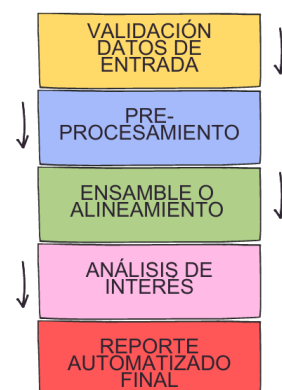
La selección de herramientas se realizará en base a criterios vinculados a la facilidad de instalación y la documentación que facilite el uso y comprensión de la herramienta, además de ejemplos de uso básico.

## **Diseño del Pipeline**

El desarrollo de un pipeline bioinformático requiere una planificación que permita garantizar su eficacia y reproducibilidad. En este contexto, se propone un pipeline bioinformático modular y flexible que permita analizar, procesar y extraer información relevante a partir de

diversas entradas de datos genómicos de bacterias. Las características claves de este pipeline incluyen:

- **Definición de los objetivos de análisis**
- **Resultados esperados**
- **Recolección de Datos:**
  - Tipo de datos
  - Formato de datos
- **Funcionalidad y análisis:**
  - Selección de Herramientas y Algoritmos
  - Flujo de trabajo para preprocesamiento
  - Flujo de trabajo para el ensamble o alineamiento
  - Flujo de trabajo de diferentes análisis de interés
- **Validación y verificación:**
  - Realizar test de confirmación
  - Reporte automatizado final
- **Documentación y Reproducibilidad**



**Figura 2:** Diseño de las etapas del flujo de trabajo (*elaboración propia*).

## **Implementación del pipeline**

Para poder transicionar del diseño previo a la implementación, es necesario el uso de gestores de flujo de trabajo como Nextflow, para automatizar y gestionar el pipeline y poder realizar el proceso de codificación. Por otra parte, para garantizar la reproducibilidad es necesario definir el entorno de ejecución del flujo de trabajo, junto a todas las herramientas y sus dependencias.

## **Documentación del pipeline**

Para garantizar una comprensión de las diferentes funcionalidades del flujo de trabajo es necesaria una explicación detallada, por lo que documentar cada paso facilitará la utilización por parte de diferentes usuarios, asimismo permitirá la verificación y reproducibilidad de diferentes resultados.

De esta manera, es necesario proporcionar instrucciones claras de cómo utilizar el flujo de trabajo, como comandos de ejecución, ejemplos de uso, e instalación, proporcionando, un ambiente de colaboración, además permitirá que los nuevos usuarios tengan a su haber un manual de uso completo.

El usar Git a través de Github, para la documentación ofrece beneficios significativos para el proyecto, como un control de versiones, mayor colaboración y accesibilidad.

## **Definición de la estructura y diseño del reporte**

Una particularidad del flujo de trabajo como se mencionó durante el diseño, es poder generar un informe automatizado, que permita capturar de manera resumida, todos los procesos que se realizaron durante la ejecución del flujo. Este, además, debe entregar al usuario la posibilidad de definir si las herramientas funcionaron correctamente.

Para definir la estructura del reporte, se debe en primer lugar, recopilar los diferentes tipos de reportes existentes, (los que ya vienen incorporados en las herramientas). Ahora, si esta no presenta una manera de generar un resumen, se deberán encontrar las herramientas adecuadas que lo permitan.

De esta manera, el reporte final tendrá la capacidad de ser dinámico, en donde se adaptará a las diferentes funciones de selección del usuario. Este presentará una portada y un resumen

de todos los procesos ejecutados en el flujo de trabajo.

## **Implementación de los reportes en el pipeline**

Una particularidad de Nextflow, es la capacidad que tiene para distribuir cada proceso en diferentes carpetas de trabajo, permitiendo una mayor claridad y manejo de los archivos de salida. De esta manera, implementar una manera de generar reportes automatizados, presenta un desafío. Aun así, la implementación se hará a través de Nextflow, utilizando un proceso final en el lenguaje de R markdown.

## **Documentación de los reportes**

La documentación de los reportes, que es una característica propia del flujo de trabajo, se hará al igual que la documentación del pipeline, en la plataforma de github.

## **Empaquetamiento del pipeline**

Para garantizar la reproducibilidad del flujo de trabajo, el código será alojado en un repositorio en github, además se deberá establecer un archivo de configuración de docker para garantizar diferentes aspectos:

- Reproducibilidad: Se podrá garantizar que el entorno de ejecución sea el mismo.
- Portabilidad: Facilita el despliegue del flujo.
- Automatización: Permite automatizar el proceso de construcción.

## 6. Resultados

Este capítulo pretende entregar resultados, con respecto a la etapas que fueron desarrolladas para conseguir el diseño final del pipeline de análisis de bacterias.

### 6.1. Búsqueda bibliográfica

#### Palabras claves

Las palabras que serán integradas en la cadena de búsqueda tienen relación directa con el desarrollo y automatización del pipeline de análisis de bacterias, la elección de la terminología adecuada, permitirá obtener información relevante y mejorará la selección de las principales herramientas que actualmente son utilizadas en flujos de trabajo. Así destacamos:

- Análisis genómico
- Metagenómica
- Análisis bioinformático
- Flujos de trabajo bioinformático
- Identificación de genes de resistencia antibiótica
- Taxonomía bacteriana

#### Cadena y filtros de búsqueda

La cadena y filtros de búsqueda, se realizó utilizando las palabras claves mencionadas, además de un filtro temporal, que se establece desde el año 2020 hasta la actualidad. De esta manera, se obtuvieron las siguientes cadenas de búsqueda:

```
("2020/01/01"[Date - Publication] : "3000"[Date - Publication])  
AND ("Genomic analysis"[Other Term])
```

```
("2020/01/01"[Date - Publication] : "3000"[Date - Publication])  
AND ("Metagenomics"[Other Term])
```

```
("2020/01/01"[Date - Publication] : "3000"[Date - Publication])
```



AND ("Bioinformatics analysis"[Other Term])

("2020/01/01"[Date - Publication] : "3000"[Date - Publication])

AND ("Bioinformatics workflows"[Other Term])

("2020/01/01"[Date - Publication] : "3000"[Date - Publication])

AND ("Identification of antibiotic resistance genes"[Other Term])

("2020/01/01"[Date - Publication] : "3000"[Date - Publication])

AND ("Bacterial taxonomy"[Other Term])).

## **Selección de base de datos**

La selección de los artículos se obtuvo de la siguiente base de datos relacionada a las Ciencias de la Salud en general. Esta correspondió a:

- Pubmed

## **Estrategia de extracción**

La estrategia de selección y exclusión de los artículos, se realizó en base a la incorporación de criterios de temporalidad, contenido y contexto asociados a este trabajo. De esta forma, podemos nombrar:

- Artículos de menos de 3 años de antigüedad.
- Artículos que han sido referenciados al menos 1 vez.
- Artículos que expliquen el flujo de trabajo utilizado.
- Artículos que describen las diferentes herramientas utilizadas.
- Artículos que utilizan bacterias para sus análisis.

## **Selección de artículos**

En este capítulo se realiza una síntesis de los artículos encontrados con carácter de relevantes, incluidos finalmente y después de los filtros ya mencionados, en la revisión sistemática. En la siguiente tabla se mostrarán los resultados obtenidos de la base de datos:

**Tabla 1:** Resultados obtenidos en la revisión sistematizada (*elaboración propia*).

<b>Nombre</b>	<b>Año</b>	<b>Terminología Asociada</b>	<b>Citas</b>
Metagenomic and network analysis revealed wide distribution of antibiotic resistance genes in monkey gut microbiota	2021	Metagenomic Identificación de genes de resistencia antibiótica Taxonomía bacteriana	9
Overview of bioinformatic methods for analysis of antibiotic resistome from genome and metagenome data	2021	Metagenomic Identificación de genes de resistencia antibiótica Taxonomía bacteriana Análisis bioinformático Flujos de trabajo bioinformático	15
LGAAP: Leishmaniinae Genome Assembly and Annotation Pipeline	2021	Análisis bioinformático Flujos de trabajo bioinformático	5
A Pipeline for Non-model Organisms for de novo Transcriptome Assembly, Annotation, and Gene Ontology Analysis Using Open Tools: Case Study with Scots Pine	2021	Análisis genómico Metagenómica Análisis bioinformático Flujos de trabajo bioinformático	6

## 6.2. Identificación de los métodos de análisis

La identificación y recopilación de los métodos de análisis, en base a la búsqueda bibliográfica nos permitió agrupar las herramientas utilizadas en cada contexto de análisis. Es así como, se muestran los siguientes resultados:

**Tabla 2:** Resultados obtenidos en la identificación de métodos de análisis para el pre-procesamiento (*elaboración propia*).

Herramienta	Sitio web	Aplicado a
Fastp	<a href="https://github.com/OpenGene/fastp">https://github.com/OpenGene/fastp</a>	Preprocesamiento de lecturas breves y control de calidad de datos WGS o WMS.
FastQC	<a href="https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/">https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/</a>	Evaluar la calidad de los datos de secuenciación de ADN en formato FASTQ
FastQ Screen	<a href="https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastq_screen/">https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastq_screen/</a>	Filtrado y control de calidad en archivos FASTQ. Detección de la presencia de secuencias no deseadas o contaminantes en los datos de secuenciación
Trimmomatic	<a href="https://www.scayle.es/manual/es/hpc/software-instalado/trimmomatic">https://www.scayle.es/manual/es/hpc/software-instalado/trimmomatic</a>	Eliminación y filtrado de lecturas

**Tabla 3:** Resultados obtenidos en la identificación de métodos de análisis para el proceso de ensamble o alineamiento (*elaboración propia*).

Herramienta	Sitio web	Aplicado a
SPAdes/ MetaSPAdes	<a href="https://cab.spbu.ru/software/spades/">https://cab.spbu.ru/software/spades/</a>	Montaje de lectura corta WGS.
Flye/metaFlye	<a href="https://github.com/fenderglass/Flye">https://github.com/fenderglass/Flye</a>	Montaje de lectura larga WGS, WMS.
Megahit	<a href="https://github.com/voutcn/megahit">https://github.com/voutcn/megahit</a>	Ensamblaje de lectura corta WMS.
PLASS	<a href="https://github.com/soedinglab/plass">https://github.com/soedinglab/plass</a>	Ensamblaje WMS a nivel de proteína.

**Tabla 4:** Resultados obtenidos en la identificación de métodos de análisis para el control de calidad (*elaboración propia*).

Herramienta	Sitio web	Aplicado a
Bowtie2	<a href="https://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml">https://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml</a>	Alineamiento de secuencias de lectura corta frente a un genoma de referencia.
SAMTools	<a href="https://www.htslib.org/">https://www.htslib.org/</a>	Procesamiento y manipulación de archivos SAM/BAM.
BUSCO	<a href="https://busco.ezlab.org/">https://busco.ezlab.org/</a>	Evaluación de la integridad y completitud de los montajes.
BLAST+	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>	Comparación de secuencias y búsqueda de similitudes entre secuencias.
DETONATE	<a href="https://hpc.nih.gov/apps/DETONATE.html">https://hpc.nih.gov/apps/DETONATE.html</a>	Evaluación y estimación de la calidad de ensamblajes transcriptómicos a través de un score.
GenomeTools	<a href="https://genometools.org/">https://genometools.org/</a>	Análisis y manipulación de datos de secuenciación genómica.
GAAS	<a href="https://github.com/NBISweden/GAAS">https://github.com/NBISweden/GAAS</a>	Control de calidad.

**Tabla 5:** Resultados obtenidos en la identificación de métodos de análisis para la identificación taxonómica (*elaboración propia*).

Herramienta	Sitio web	Aplicado a
GTDB/GTDB-Tk	<a href="https://gtdb.ecogenomic.org/">https://gtdb.ecogenomic.org/</a>	Base de datos para taxonomía genómica
EzBioCloud	<a href="https://www.ezbiocloud.net/">https://www.ezbiocloud.net/</a>	Genomas y genes de ARNr 16S seleccionados por taxonomía
Kraken2	<a href="https://ccb.jhu.edu/software/kraken2">https://ccb.jhu.edu/software/kraken2</a>	Sistema de clasificación taxonómica
DIAMOND	<a href="https://github.com/bbuchfink/diamond">https://github.com/bbuchfink/diamond</a>	Clasificador taxonómico

**Tabla 6:** Resultados obtenidos en la identificación de métodos de análisis para la identificación de genes de resistencia antibiótica (*elaboración propia*).

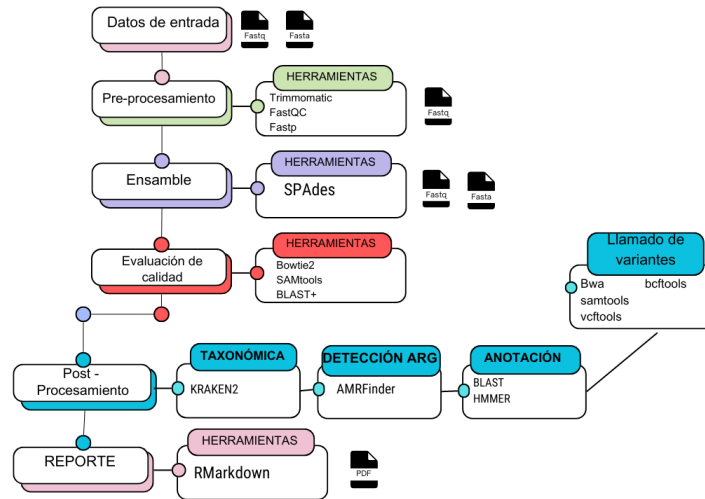
Herramienta	Sitio web	Aplicado a
CARD/RGI	<a href="https://card.mcmaster.ca/">https://card.mcmaster.ca/</a>	Base de datos de ARG
AMRFinder	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/antimicrobial-resistance/AMRFinder/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/antimicrobial-resistance/AMRFinder/</a>	Base de datos ARG por NCBI
ResFinder	<a href="https://github.com/cadms/resfinder">https://github.com/cadms/resfinder</a>	Herramientas para la identificación de ARG adquiridos y mutaciones puntuales basadas en las bases de datos por CGE
ARG-OAP/SARG	<a href="http://smile.hku.hk/SARGs">http://smile.hku.hk/SARGs</a>	El perfil directo de ARG del metagenoma
DeepARG	<a href="https://github.com/gaarangoa/deeparg2.0">https://github.com/gaarangoa/deeparg2.0</a>	Perfil directo del ARG

**Tabla 7:** Resultados obtenidos en la identificación de métodos de análisis para la anotación funcional (*elaboración propia*).

Herramienta	Sitio web	Aplicado a
Maker2	<a href="https://www.yandell-lab.org/software/maker.html">https://www.yandell-lab.org/software/maker.html</a>	Anotación basada en evidencia
AUGUSTUS	<a href="https://bioinf.uni-greifswald.de/augustus/">https://bioinf.uni-greifswald.de/augustus/</a>	Anotación ab initio
BlastX	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?</a>	Asignación de anotaciones
GenomeTools	<a href="https://genometools.org/">https://genometools.org/</a>	Control de calidad de la anotación
GAAS	<a href="https://github.com/NBISweden/GAAS">https://github.com/NBISweden/GAAS</a>	Control de calidad de la anotación
AGAT	<a href="https://github.com/NBISweden/AGAT">https://github.com/NBISweden/AGAT</a>	Anotación de estadísticas de calidad
HMMER	<a href="http://hmmer.org/">http://hmmer.org/</a>	Búsqueda y alineamiento de perfiles HMM
InterProScan	<a href="https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/">https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/</a>	Búsqueda de dominios y familias de proteínas en secuencias
SignalP	<a href="https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/">https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/</a>	Predicción de péptidos señal en secuencias de proteínas
Transdecoder	<a href="https://bio.tools/TransDecoder">https://bio.tools/TransDecoder</a>	ORF prediction, Identificación de ORFs y predicción de genes a partir de transcritos
BEDTools	<a href="https://bedtools.readthedocs.io/en/latest/">https://bedtools.readthedocs.io/en/latest/</a>	Enmascaramiento de contaminantes

### 6.3. Evaluación y selección de los métodos de análisis

La evaluación y selección de métodos de análisis, se realizó en base a herramientas que cumplieran con criterios relacionados, por una parte, con la facilidad de instalación y por otra, con la existencia de documentación pertinente, para facilitar el uso y comprensión de esta herramienta y que incorporara además, ejemplos de uso básico. A continuación, se muestran las herramientas en el proceso o flujo de trabajo:



**Figura 3:** Selección de herramientas y definición de los procesos del flujo de trabajo (*elaboración propia*).

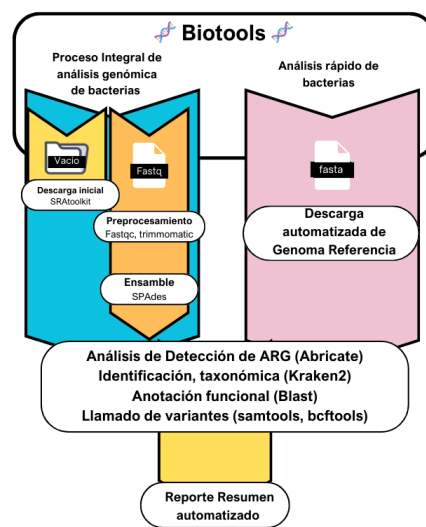
En la figura 3 se puede observar cada etapa que será parte del flujo de trabajo. A continuación se definen las características generales y utilidad de cada una de ellas:

- **Datos de entrada:** En esta etapa, el flujo de trabajo tendrá la capacidad de detectar y validar el formato entregado por el usuario. Es decir, si el usuario entrega un directorio que presente archivos variados como .csv .fasta .fq o bien .fq.gz, solo admitirá los que presenten .fasta .fq o .fq.gz.
- **Pre-procesamiento:** Para la etapa de pre-procesamiento, el usuario puede ejecutar el programa que prefiera en los archivos de entrada previos. De esta manera, podrá limpiar, recortar o filtrar las lecturas antes de un ensamble o alineamiento o por el contrario, visualizar la calidad de las lecturas.
- **Ensamble o alineamiento:** Esta etapa permite ensamblar o alinear las lecturas de entrada de usuario. Este podrá recibir las lecturas previamente pre-procesadas o bien, recibir las lecturas directamente de un archivo de entrada.
- **Evaluación de calidad:** La evaluación de calidad, ofrecerá al usuario la posibilidad de tener en una carpeta de trabajo de Nextflow, todos los archivos de salida que se obtuvieron al calcular la calidad del ensamble o alineamiento.
- **Post-procesamiento:** La etapa de post-procesamiento, le otorga al usuario la opción

de seleccionar, qué tipo de análisis quiere llevar a cabo en la cantidad disponible, Dentro de la tipología de análisis, el usuario puede considerar los siguientes:

- Análisis taxonómico
  - Detección de genes de resistencia antibiótica
  - Anotación funcional
  - Llamado de variantes
- **Reporte:** Finalmente, la característica del reporte, no es una opción que el usuario pueda desactivar o activar. Asimismo, este ofrecerá al usuario la información resumida de todos los procesos ejecutados dentro del flujo de trabajo, ya sea, pre-procesamiento, ensamble o alineamiento o cualquier análisis.

## 6.4. Diseño e implementación del flujo de trabajo



**Figura 4:** Diseño del flujo de trabajo (*elaboración propia*).

Como se puede observar en la Fig.4 el flujo de trabajo consta de subflujos que determinan cómo los datos de entrada hacen variar la cantidad de procesos que se ejecutan.

El primer proceso que se puede observar es el proceso integral de análisis genómico de bacterias, en donde a partir del parámetro de entrada o dato de entrada, variará el flujo de trabajo.



La descarga inicia descrita en la Fig.4, en el caso de que el usuario presente un directorio vacío acompañado de un código SRR (*Sequence Read Archive Run*), (que es un identificador único que se asigna a un conjunto específico de lecturas), podrá descargar desde NCBI las muestras. Al usuario, se le brinda la posibilidad de utilizar varios parámetros, es aquí, donde se encuentra `--path` que determina el directorio vacío, y en donde las lecturas descargadas serán almacenadas. En el caso de `--id_sra`, hace referencia al identificador de la lectura, que acompañado con el `--x` determinará la cantidad de lecturas a descargar. Si las lecturas presentan una librería Layout: PAIRED, se hace imprescindible la utilización de `--pairs`.

```
1 nextflow run script.nf --path [directorio] \  
2 --id_sra [SRRXXXXXX] --x [lectura] --pairs
```

**Listing 1:** Sub-flujo de trabajo para la descarga inicial de lecturas (*elaboración propia*).

El flujo integral de análisis genómico de bacterias descrito en la Fig.4 permite que el usuario, al presentar un directorio que no esté vacío, almacene en un canal de trabajo de Nextflow, particularmente aquellos archivos que presenten la extensión de .fq, .fasta o .fq.gz o .fasta.gz. Cabe mencionar que, cualquier archivo que esté comprimido será descomprimido. El primer paso que puede activar el usuario, es la etapa de preprocesamiento, aquí el usuario puede utilizar herramientas como Fastqc o Trimmomatic. En el caso de utilizar Fastqc en todos los archivos dentro del directorio de entrada, la salida será una carpeta comprimida. La utilización de este programa limita las acciones que puede realizar el usuario, ya que no tiene una entrada válida para otro programa, tal como se puede observar en el List.2

```
1 nextflow run script.nf --path [directorio] \  
2 --fastqc
```

**Listing 2:** Comando para el preprocesamiento de las lecturas con Fastqc (*elaboración propia*).

Es importante remarcar que, una de las herramienta que se complementa muy bien con las demás, es Trimmomatic. Esta herramienta, situándose dentro del grupo de trabajo, se le pueden utilizar las principales características del programa como tal, y como consecuencia, el archivo de salida será apto para poder ensamblarse o alinearse, de acuerdo a como lo prefiera el usuario.

```

1      nextflow run script.nf --path [directorio de entrada] \
2          --trimmo [se o pe] \
3          --threads [num de hilos] \
4          --leading [valor de calidad para el recorte inicial] \
5          --trailing [valor de calidad para el recorte final] \
6          --slidingwindow [tamano de ventana: calidad min] \
7          --minlen [longitud min. de lectura]

```

**Listing 3:** Comando de ejecución de etapa de pre procesamiento (*elaboración propia*).

En el List.3 se presentan los diferentes parámetros admitidos dentro del flujo de trabajo para una utilización de Trimmomatic, estos variarán de acuerdo a los requerimientos de cada usuario y de sus datos. La salida de este proceso es admitida para un ensamble o alineamiento.

La entrada para el proceso de ensamble o alineamiento, puede venir de un proceso previo, como fue descrito anteriormente, o bien, puede ser, a través de un archivo directo, entregado por el usuario (*como se explica en la Fig. 4 en el análisis rápido de bacterias*). De esta manera, la salida de este proceso permitirá la utilización de los diferentes análisis disponibles.

De acuerdo a lo anterior, los análisis disponibles, vendrán a complementar el proceso de ensamble y alineamiento, para así contar con una mayor claridad con respecto a las muestras. Estos análisis, corresponden al análisis de detección de genes de resistencia antibiótica, análisis taxonómico, una anotación funcional y finalmente un llamado de variantes. Todos los análisis pueden ser usados, a través de la salida del ensamble o alineamiento, o bien a través de la entrada directa de una muestra (ver la Fig.4 en el análisis rápido de bacterias).

## Análisis de detección de genes de resistencia antibiótica

El primer análisis que se puede describir, en razón de su utilización dentro del flujo de trabajo, corresponde al análisis de detección de genes de resistencia antibiótica. Este análisis, permite identificar y caracterizar genes de resistencia a antibióticos en secuencias genómicas. Su utilización, a través del flujo de trabajo se puede observar en la List.4 y List.5, con un análisis rápido o un análisis integral genómico de bacterias respectivamente.

```

1      nextflow run script.nf --f [archivo de muestras] \
2          --arg [activar ARG] \
3          --dbarg [base de datos de anotacion]

```

**Listing 4:** Comando para ejecutar un análisis rápido de identificación de genes de resistencia antibiótica (*elaboración propia*).

```

1      nextflow run script.nf --path [directorio de entrada] \
2          --trimmo [se o pe] \
3          --threads [num de hilos] \
4          --leading [valor de calidad para el recorte inicial] \
5          --trailing [valor de calidad para el recorte final] \
6          --slidingwindow [tamano de ventana: calidad min] \
7          --minlen [longitud min. de lectura] \
8          --arg [activar ARG] \
9          --dbarg [base de datos de anotacion]

```

**Listing 5:** Comando para la ejecución de un análisis de ARG (*elaboración propia*).

En el List.5 se puede observar cómo se implementan los procesos de preprocesamiento y ensamble, junto al análisis de detección de genes de resistencia antibiótica. En esta etapa, sólo se necesita para activar el proceso, la bandera `--arg` y para seleccionar la base de datos para la anotación `--dbarg`. Cabe destacar, que esto no impide que otros análisis sean activados por el usuario.

## Análisis taxonómico

En el caso del análisis taxonómico, se refiere a la identificación de los organismos presentes en una muestra, a partir de sus secuencias de ADN o ARN.

```

1      nextflow run script.nf --f [archivo de muestras] \
2          --taxonomy [activar opc] \
3          --db [ruta a la base de datos]

```

**Listing 6:** Comando para ejecutar un análisis rápido de identificación taxonómica (*elaboración propia*).

```

1      nextflow run script.nf --path [directorio de entrada] \
2          --trimmo [se o pe] \
3          --threads [num de hilos] \

```

```

4      --leading [valor de calidad para el recorte inicial] \
5      --trailing [valor de calidad para el recorte final] \
6      --slidingwindow [tamano de ventana: calidad min] \
7      --minlen [longitud min. de lectura] \
8      --taxonomy [activar opc] \
9      --db [ruta a la base de datos]

```

**Listing 7:** Comando para la ejecución de un análisis de identificación taxonómica (*elaboración propia*).

En el List.6 y List.7 se puede observar, cómo utilizar este análisis, a través del flujo de trabajo, en un análisis rápido o en un análisis más completo. El usuario para activar la opción debe utilizar `--taxonomy`, y además ingresar con `--db` la ruta a la base de datos que desee utilizar.

## Análisis de llamado de variantes

Un llamado de variantes, es poder identificar diferencias genéticas, como SNPs, pequeñas inserciones o deleciones (*indels*), comparando las secuencias de una muestra con una referencia. En este caso, el usuario podrá utilizar como muestra el resultado del ensamblaje o alineamiento (ver List.9) o bien, puede optar por ingresar un archivo .fasta para la comparación. Sin embargo, con eso no basta, el debe ingresar un genoma de referencia, a través del parámetro `--variantRef`. Si por alguna razón, no presenta un genoma de referencia pero sí presenta un identificador NC de NCBI, lo podrá realizar, a través del parámetro `--variantRefId`.

```

1      nextflow run script.nf --f [archivo de muestras] \
2      --variantCall [activar opc] \
3      --variantRef [ruta del genoma de referencia]

```

**Listing 8:** Comando para ejecutar un análisis rápido de llamado de variantes (*elaboración propia*).

```

1      nextflow run script.nf --path [directorio de entrada] \
2      --trimmo [se o pe] \
3      --threads [num de hilos] \
4      --leading [valor de calidad para el recorte inicial] \
5      --trailing [valor de calidad para el recorte final] \
6      --slidingwindow [tamano de ventana: calidad min] \
7      --minlen [longitud min. de lectura] \

```

```

8      --variantCall [activar opc] \
9      --variantRef [ruta del genoma de referencia]

```

**Listing 9:** Comando para la ejecución de un análisis de llamado de variantes (*elaboración propia*).

## Análisis para generar una anotación funcional

El último análisis disponible, dentro del flujo de trabajo, corresponde a la anotación funcional, que se refiere al proceso de asignar, anotar funciones biológicas a las secuencias, como genes o variantes. En este mismo contexto, el usuario podrá activar esta opción con el parámetro `--annotation` y entregando la ruta al archivo para generar la base de datos con `--ref annotation`.

```

1      nextflow run script.nf --f [archivo de muestras] \
2      --annotation [activar opc] \
3      --refannotation [archivo para crear base de datos]

```

**Listing 10:** Comando para ejecutar un análisis rápido de anotación funcional (*elaboración propia*).

```

1      nextflow run script.nf --path [directorio de entrada] \
2      --trimmo [se o pe] \
3      --threads [num de hilos] \
4      --leading [valor de calidad para el recorte inicial] \
5      --trailing [valor de calidad para el recorte final] \
6      --slidingwindow [tamano de ventana: calidad min] \
7      --minlen [longitud min. de lectura] \
8      --annotation [activar opc] \
9      --refannotation [archivo para crear base de datos]

```

**Listing 11:** Comando para la ejecución de una anotación funcional (*elaboración propia*).

Por último, se debe indicar que cada proceso ejecutado durante el flujo de trabajo, tiene su propio ambiente, que corresponde a una carpeta o directorio dentro de una asignada por Nextflow. En este caso, nos referimos a la carpeta `works`, aquí se podrán encontrar todas las salidas de las herramientas utilizadas y los links o rutas simbólicas a los archivos de entrada.

## 6.5. Casos de estudio

En este capítulo, se presentarán diferentes casos de estudio para representar una ejecución del flujo de trabajo en un ambiente investigativo. Esto se realizará por cada análisis por separado, de modo de verificar y controlar los resultados.

### Caracterización de Genes de Resistencia Antibiótica y Clasificación Taxonómica en *Escherichia coli*

El primer caso corresponde a la evaluación de la *Escherichia coli* (*E. coli*), comúnmente encontrada en el intestino del humano y otros animales. La mayoría de las cepas de *E. coli* son inofensivas, sin embargo, algunas cepas pueden causar infecciones graves, como diarrea, o enfermedades respiratorias. En este contexto, la evaluación o detección de genes de resistencia antibiótica es crucial, debido a su capacidad de adquirir o transferir resistencia, representando un desafío significativo para la salud pública.

En primer lugar, una vez realizada la búsqueda en NCBI SRA, para identificar un SRR de *Escherichia coli* (*E. coli*) válido, se usará la descarga inicial del flujo de trabajo, como se muestra en el List.12.

```
1      nextflow run script.nf --path [directorio] \
2          --id_sra SRR291523311 \
3          --x 500 \
4          --pairs
```

**Listing 12:** Comando para la descarga inicial de las muestras de *Escherichia coli* (elaboración propia).

En el List.12, se puede apreciar la utilización de parámetros como es el caso de `--path`, que puede ser cualquier directorio vacío, `--id_sra` que se le entrega el código SRR de NCBI, en donde, las muestras presentan una librería PAIRED, por lo que se hace imprescindible la utilización de `--pairs` y la cantidad de lecturas a descargar, que en este caso solo serán las primeras 500. Una vez obtenidas las lecturas a utilizar de *Escherichia coli* (*E. coli*), se utilizara el flujo de trabajo que lleva por nombre, “proceso integral de análisis de bacterias” para poder realizar un preprocesamiento, un ensamble y un análisis de detección de genes de resistencia antibiótica. De esta manera, los parámetros utilizados se pueden observar en la figura que a continuación se presenta:

```
1      nextflow run script.nf --path misc/mocks \  
2          --trimmo pe \  
3          --threads 3 \  
4          --leading 3 \  
5          --trailing 3 \  
6          --minlen 36 \  
7          --spades \  
8          --arg \  
9          --typedb plasmidfinder
```

**Listing 13:** Comando para la identificación de ARG de *Escherichia coli* (elaboración propia).

Para la realización de este análisis, el preprocesamiento de las lecturas se ejecutó en base a un filtrado, en donde el valor de calidad para recorte inicial (*leading*) tiene un valor de 3, el valor de calidad para el recorte final (*trailing*) será de 3 y la longitud mínima de lectura (*minlen*) tendrá un valor de 36. De esta manera, el ensamble de novo se debería realizar de manera exitosa, permitiendo la utilización de la base de datos plasmidfinder para detectar genes de resistencia antibiótica.

Los resultados de la detección de genes de resistencia antibiótica identificaron la presencia del gen Col(BS512)\_1 en la secuencia, con una cobertura del 87.98 % y una identidad del 99.51 %. Este gen, está registrado en la base de datos plasmidfinder bajo el acceso NC\_010656.

A modo de, sintetizar la etapa de casos de uso, y brindar un mayor entendimiento del cómo funcionan los análisis dentro del flujo de trabajo, el análisis taxonómico se realizará en base a la misma muestra de *Escherichia coli* (*E. coli*). De esta manera, si se entrega directamente una muestra de *Escherichia coli* a Kraken 2, el software intentará clasificar de acuerdo a su base de datos taxonómica predefinida para identificar el organismo al que pertenece. En este caso, al tratarse de *Escherichia coli*, Kraken 2 debería clasificar correctamente la secuencia como perteneciente a esa especie bacteriana.

De esta manera, se realizó un análisis taxonómico de una muestra de *Escherichia coli* utilizando la herramienta kraken 2. El objetivo es identificar la composición taxonómica de la muestra y determinar si presenta elementos virales.

Para la ejecución del flujo de trabajo, se debe descargar la base de datos de kraken 2 para determinar la presencia de elementos virales, utilizando el parámetro `--dbdownload`

y el nombre de la base de datos que es *Viral*. De esta manera, se puede continuar con la ejecución del flujo de trabajo, con los parámetros que se pueden ver en el List.14:

```
1      nextflow run script.nf --path misc/mocks \  
2          --trimmo pe \  
3          --threads 3 \  
4          --leading 3 \  
5          --trailing 3 \  
6          --minlen 36 \  
7          --spades \  
8          --taxonomy \  
9          --db [base de datos viral]
```

**Listing 14:** Comando para la identificación taxonómica de *Escherichia coli* (elaboración propia).

Entonces, se utilizó una base de datos viral de Kraken 2 que incluye secuencias de diversos organismos, y la ejecución del comando del List.14, los resultados se pueden ver en anexos.

Se detectaron secuencias no clasificadas, que pueden deberse a secuencias de baja calidad, incompletas o que no tienen coincidencias en la base de datos utilizada, que corresponden al 94.87 % (37 secuencias). Al mismo tiempo, el 5.13 % de las secuencias, fueron clasificadas como virus pertenecientes al reino Duplodnaviria. Además, se detectó la presencia de *Escherichia* phage 5004651 y *Escherichia* phage ev099, qué son los fagos que infectan *Escherichia coli*.

Para concluir sobre este caso de estudio, el análisis taxonómico realizado con el flujo de trabajo, permitió identificar una pequeña muestra de secuencias virales que infectan *Escherichia coli*. Sin embargo, la alta cantidad de secuencias no clasificadas demuestra que hay una necesidad de mejorar la calidad de las lecturas o bien, cambiar la base de datos.

### **Análisis Funcional y Bioinformático de Beta-Galactosidasa en *Escherichia coli***

En cuanto al caso de estudio siguiente, lo que se realizará, es un análisis funcional de Beta-Galactosidasa de *Escherichia coli*, utilizando el flujo de trabajo. Cabe mencionar que la beta-galactosidasa, es una enzima producida por la bacteria que cataliza la hidrólisis de la lactosa en glucosa y galactosa.

En primer término, se obtuvieron todas las secuencias de beta-galactosidasa de *Escherichia coli* desde la base de datos UniProt en formato FASTA, luego se buscó “*Escherichia*



*coli beta-galactosidase*”, en la base de datos NCBI Nucleotide y se descargó la secuencia de nucleótidos correspondiente en formato FASTA. Finalmente, era necesario identificar todos los ORFs (*Open Reading Frames*) en la secuencia obtenida de NCBI Nucleotide, usando la herramienta ORF finder. De esta manera, el flujo tendría todo lo necesario para ejecutar el análisis con el comando, tal como señala el List.15:

```
1      nextflow run script.nf --f ORF.fa \
2      --annotation \
3      --annotationDb database.fa \
4      --annotationType prot
```

**Listing 15:** Comando para la anotación funcional de *Escherichia coli* (elaboración propia).

Los resultados de la anotación funcional de los ORFs, que se encuentran en la tabla de anexos, arrojan que de los siete ORFs en la secuencia de ADN de *E. coli*, ninguno de los ORFs mostró coincidencias significativas en la base de datos utilizada. Lo anterior, puede deberse a varias razones, entre ellas, que la base de datos BLAST utilizada, podría no presentar secuencias correspondientes o bien, los ORFs podrían ser regiones no codificantes o no estar anotadas previamente. Sin embargo, aunque no se obtuvieron los resultados esperados, si se puede tener el alcance de la funcionalidad del flujo de trabajo.

## Análisis de Variantes Genéticas en *Escherichia coli* Mediante el Genoma de Referencia ASM584v2

Para el siguiente caso de estudio y para validar la implementación de la llamada de variantes se descargará el genoma de referencia *ASM584v2* de *Escherichia coli* para identificar variantes genéticas. A continuación se mostrará el comando ejecutado:

```
1      nextflow run script.nf --path misc/mocks/ \
2      --trimmo pe \
3      --threads 3 \
4      --leading 3 \
5      --trailing 3 \
6      --minlen 3 \
7      --spades \
8      --variantCall \
9      --variantRef GCA_000005845.2_ASM584v2_genomic.fna
```

**Listing 16:** Comando para realizar un llama de variantes en *Escherichia coli* (elaboración propia).

Considerando que el *variant calling* es crucial para entender las diferencias genéticas y su impacto funcional. Este proceso es la base de muchos estudios genómicos y tiene aplicaciones directas en medicina, de esta manera, se detectaron 90 SNPs en la muestra analizada, también el ratio de transiciones a transversiones (*ts/tv*) fue de 2.10, que es un indicador de la calidad del llamado de variantes.

La implementación del flujo de trabajo, y con ello de las herramientas que llevan a cabo los diferentes análisis, fue generado en un ambiente controlado, que posteriormente, tendrá que empaquetarse para garantizar su reproducibilidad, junto además, a la generación de una documentación.

## 6.6. Diseño y estructura de los reportes

La definición del diseño y estructura de los reportes, se basa en primer lugar en encontrar la manera de entregarle al usuario la información precisa o resumida sobre un análisis o proceso realizado.

En el análisis de llamado de variantes, al tener varios procesos, que se ejecutan para llegar al resultado se empleo la estrategia, de solo mostrarle al usuario las estadísticas del resultado final. De esta manera, se usará un método propio de *bcftools* para generarlo, tal como se muestra a continuación.

```
1 bcftools stats $vcf > report_variant_calling.txt
```

**Listing 17:** Comando para la generación de estadísticas en el análisis de llamado de variantes (*elaboración propia*).

El comando del List.17, representa la evaluación de la funcionalidad de la herramienta, dentro de un proceso de Nextflow que permite la producción de un archivo de texto con estadísticas.

En el caso del análisis de identificación taxonómica, se optó por la utilización del mismo archivo de salida, en la generación del informe para el usuario. La implementación dentro de un proceso de Nextflow se puede ver a continuación:

```
1 kraken2 --db $db --report report_taxonomy.txt $spades_output
```

**Listing 18:** Comando para la generación del reporte de llamado de variantes (*elaboración propia*).

La anotación funcional tiene un archivo de salida bastante extenso con información que no es clara en un primero momento, y que necesita un mayor análisis. De esta manera, es necesario entregarle al usuario la información que permita conocer si el proceso se llevo a cabo de manera correcta. Así, la estrategia fue quedarse sólo con las líneas del archivo de salida que representen una anotación, esta se puede observar a continuación.

```
1      awk '!/^#/' \${directorio} > filtered_annotation.txt \
2      echo "Resumen_GENERAL_de_anotaciones:" > report_annotation.txt \
3      echo "El_numero_de_anotaciones_finales_es_de:\$(grep -c -v '^#' \
      annotationN.txt)" >> report_annotation.txt \
4      cat filtered_annotation.txt >> report_annotation.txt
```

**Listing 19:** Comandos para la generación del reporte de anotación funcional (*elaboración propia*).

De esta manera, eliminamos o filtramos el archivo de salida dejando solo las anotaciones, permitiendo al usuario obtener información de que si el proceso fue realizado de manera correcta o no.

En el caso de la salida de el análisis de detección de genes de resistencia antibiótica, al no representar un archivo de texto extenso, y su análisis visual es de fácil interpretación, se utilizará para la generación de de reporte para el usuario.

```
1      abricate \$output_spades --db \$type --csv > report_arg.txt
```

**Listing 20:** Comandos para la generación del reporte de análisis de detección de resistencia antibiótica (*elaboración propia*).

La herramienta de trimmomatic, presenta la funcionalidad de generar unas estadísticas al finalizar de ejecutarse, de esta manera, para la generación del reporte automatizado final, solo se copiara este archivo.

```
1      cp \${directorio}/stats_summary.txt report_trimmomatic.txt
```

**Listing 21:** Comando para el reporte de la ejecución de trimmomatic (*elaboración propia*).

Finalmente, al igual que trimmomatic, Spades presenta un reporte al terminar su trabajo. Así, se utilizará el archivo *params.txt* y el *warnings.log* para que el usuario tenga la mayor cantidad de información resumida en el reporte final.

```
1      cat \${directorio}/params.txt <(echo) \${directorio}/warnings.log >
      report_spades.txt
```

---

**Listing 22:** Comando para el reporte de la ejecución de Spades (*elaboración propia*).

Todos los archivos, durante la ejecución se irán almacenando en un directorio de nombre *reports/* para que al terminar el proceso principal, y antes de terminar la ejecución del flujo de trabajo se genere un reporte automatizado final. Para generar la estructura del informe, se usará el lenguaje de *R* y la biblioteca de *RMarkdown* para realzar un Script.

La estructura del informe, es sencilla, donde estará en primer lugar el nombre del archivo, el nombre del flujo de trabajo y la fecha de realización. Posteriormente, se irán inyectando los reportes de los procesos ejecutados en el pdf, se generará una subsección para cada archivo inyectado y se respetará el formato de cada uno de ellos.

## 6.7. Implementación de los reportes

La implementación de los reportes, planteó un desafío ya que Nextflow no maneja eventos posteriores al flujo de trabajo principal haya terminado. Por otro lado, Nextflow tiene su propia manera de manejar los archivos de salida de cada proceso, almacenando los archivos de salida con un identificador dinámico difícil de manejar.

De esta manera, era necesario generar una forma de determinar el momento exacto que los archivos de salida asíncronos de los procesos ejecutados por el usuario haya terminado para finalmente utilizarlos para generar un reporte.

La estrategia utilizada para determinar, qué procesos fueron seleccionados por el usuario, y de esta forma el reporte tenga una estructura dinámica fue generar una dependencia a un canal de cola, una funcionalidad propia de Nextflow. Esto permite, que el código intérprete que debe esperar que el canal reciba un valor para continuar con el proceso del informe.

Así, si los parámetros *trimmo* y *spades* están presentes, se evaluarán diferentes combinaciones de los parámetros *taxonomy*, *arg*, *annotation* y *variantCall* para determinar qué acciones tomar y qué resultados visualizar. La siguiente tabla detalla las combinaciones posibles y las acciones correspondientes.

**Tabla 8:** Estrategía utilizada para la implementación de los reportes con sus respectivas acciones (elaboración propia).

<b>Taxonomy</b>	<b>ARG</b>	<b>Annotation</b>	<b>VariantCall</b>	<b>Acción</b>
False	False	False	False	Visualizar solo el resultado de Spades
False	False	False	True	Visualizar el resultado de Variant Calling
False	False	True	False	Visualizar el resultado de Annotation
False	False	True	True	Visualizar los resultados de Annotation y Variant Calling
False	True	False	False	Visualizar el resultado de ARG
False	True	False	True	Visualizar los resultados de ARG y Variant Calling
False	True	True	False	Visualizar los resultados de ARG y Annotation
False	True	True	True	Visualizar los resultados de ARG, Annotation, y Variant Calling
True	False	False	False	Visualizar el resultado de Taxonomy
True	False	False	True	Visualizar los resultados de Taxonomy y Variant Calling
True	False	True	False	Visualizar los resultados de Taxonomy y Annotation
True	False	True	True	Visualizar los resultados de Taxonomy, Annotation, y Variant Calling
True	True	False	False	Visualizar los resultados de Taxonomy y ARG
True	True	False	True	Visualizar los resultados de Taxonomy, ARG, y Variant Calling

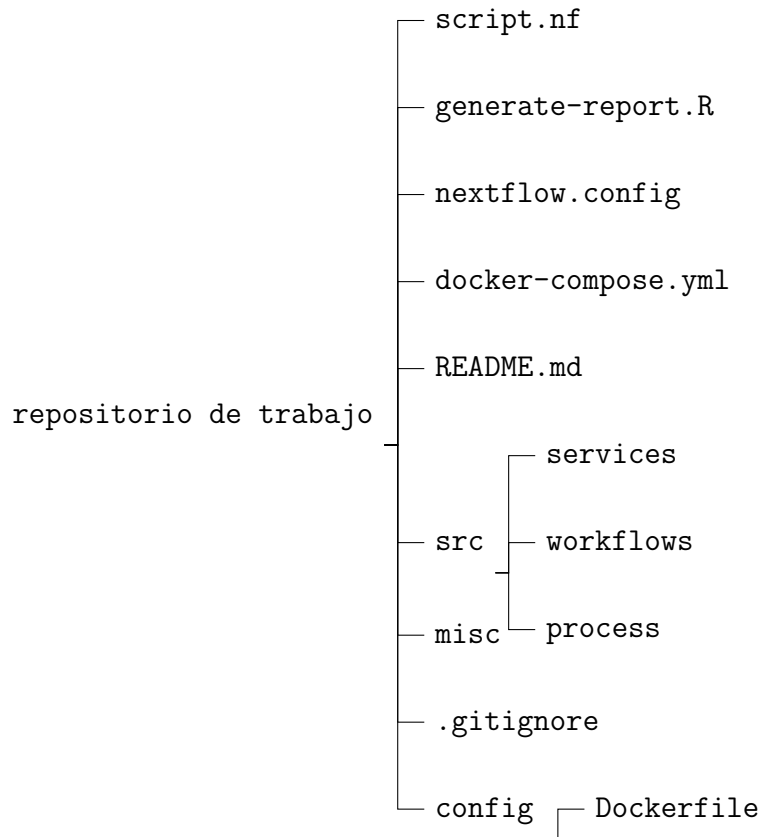
*Continúa en la siguiente página*

Taxonomy	ARG	Annotation	VariantCall	Acción
True	True	True	False	Visualizar los resultados de Taxonomy, ARG y Annotation
True	True	True	True	Visualizar todos los resultados

Destacar, que esta fue la estrategia para el flujo de trabajo con ensamble o alineamiento, o para un análisis rápido de bacterias.

## 6.8. Documentación del flujo de trabajo

El flujo de trabajo está alojado dentro de un repositorio de GitHub, este sigue una estructura sencilla de organización que se puede ver en la figura a continuación.



**Figura 5:** Estructura del repositorio de trabajo.

Es una estructura sencilla en donde en el directorio `config`, se contienen todos los archivos de configuración específicos, en este caso el `Dockerfile`. En el caso del directorio `misc`, es un directorio misceláneo que solo se utiliza para archivos que puedan ser necesarios, como las muestras utilizadas en los casos de estudio. El directorio principal que contiene el código fuente del proyecto es el nombrado `src`, este presenta otros tres directorios que son `process`, que contiene las definiciones de todos los procesos utilizados en el flujo, el directorio `workflow` que define todos los subflujos de trabajo del pipeline, y finalmente `services`, que son todas las utilidades y validaciones necesarias para el correcto funcionamiento del flujo. Además de la carpeta principal `src`, se tienen archivos en la raíz del proyecto como el `gitignore`, que especifica los archivos o directorios ignorados por el git, el archivo `README` que describe la documentación del proyecto, el archivo `docker-compose.yml` que es el archivo de configuración del servicio de docker, el `nextflow.config`, que es el archivo de configuración de Nextflow, contiene parámetros y ajustes de memoria, y finalmente el `script.nf` que es el archivo que define el flujo de trabajo.

La documentación del flujo de trabajo, se llevó a cabo en el archivo `README`, y presenta un encabezado con el título del proyecto y varias insignias que indican la versión, estado de construcción, cobertura de código y licencia. La Introducción explica el propósito del pipeline desarrollado en NextFlow para el análisis de bacterias, destacando su accesibilidad y automatización. La sección de Instalación y Configuración proporciona instrucciones para clonar el repositorio, instalar Docker Desktop y generar la imagen Docker necesaria. Las Instrucciones de Uso detallan los pasos para comenzar a usar el pipeline, incluyendo la configuración de directorios y parámetros específicos. La sección de Preprocesamiento describe el uso de herramientas como FastQC y Trimmomatic para procesar las lecturas de secuenciación antes del análisis. En Ensamble, se explica cómo ensamblar genomas bacterianos utilizando SPAdes, incluyendo opciones para preprocesamiento y ensamblaje conjunto. La sección de Análisis incluye sub-secciones sobre la identificación taxonómica usando Kraken 2, la identificación de genes de resistencia a antibióticos usando AMRFinder, el llamado de variantes genéticas, y la anotación funcional de secuencias ensambladas. Un Ejemplo de Uso proporciona un ejemplo de ejecución del pipeline que combina varios análisis a partir de un directorio con datos de trabajo. La sección de Reporte informa sobre la generación de un informe resumen en formato PDF con los resultados del pipeline, destacando la disponibilidad de output detallado en la carpeta `work`. Configuración Avanzada ofrece instrucciones para

configurar directorios de trabajo y otros parámetros en el archivo `nextflow.config`. La sección sobre Detalles sobre las versiones específicas de las herramientas utilizadas lista todas las dependencias y requisitos de software utilizados en el proyecto. Solución de Problemas proporciona consejos para resolver problemas comunes en los procesos de ensamblaje, anotación y taxonomía. Finalmente, la sección de Licencia informa sobre la licencia MIT bajo la cual se distribuye el proyecto.

## 6.9. Empaquetamiento del flujo de trabajo

Para el empaquetamiento del flujo de trabajo, se utilizó la herramienta de docker, que permite la automatización del despliegue de aplicaciones dentro de contenedores. En nuestro caso, se seleccionó una imagen base de Ubuntu para construir el contenedor. Esta se seleccionó, ya que es una opción estándar debido a su estabilidad y amplia compatibilidad con diversas herramientas, bibliotecas y dependencias, es decir, garantizamos un entorno reproducible y portátil.

Para integrar Docker con Nextflow y escalar el flujo de trabajo, se configuró un servicio en el directorio de configuración del repositorio. Aquí se define cómo se construye el contenedor y cómo se montan los volúmenes para asegurar que los archivos de trabajo estén disponibles dentro del contenedor. Esta se puede ver en la figura 23 siguiente.

```
1      services:
2          pipeline:
3              build:
4                  context:
5                      dockerfile: ./config/Dockerfile
6              volumes:
7                  - ${PWD}:/workspace
```

**Listing 23:** Código para la elaboración del servicio de docker (*elaboración propia*).

En el List.23 se puede apreciar la configuración del archivo para generar el servicio, en este se aprecia la palabra reservada `context`, que vendría a ser el contexto de construcción, es decir, se refiere al directorio desde el cual Docker copiará los archivos a la imagen del contenedor. Al mismo tiempo, se visualiza la palabra reservada `Dockerfile`, que es la ruta al archivo `Dockerfile` que define cómo construir la imagen. Volumes, o en español volúmenes,



monta el directorio de trabajo actual, dentro del contenedor, permitiendo tener acceso a los archivos del proyecto.

Dentro del archivo de configuración de docker, o dockerfile, se encuentran todas las dependencias y herramientas vitales para la ejecución del flujo de trabajo, a continuación se nombrarán las herramientas instaladas dentro de la imagen de docker.

**Tabla 9:** Información sobre las herramientas instaladas dentro de la imagen docker (elaboración propia).

Herramienta / dependencia	Descripción
Ubuntu	Sistema operativo base utilizado en el contenedor
openjdk-11-jre-headless	Entorno de ejecución de Java necesario para ejecutar aplicaciones Java sin interfaz gráfica.
curl	Herramienta de línea de comandos para transferir datos con URL
unzip	Utilidad para descomprimir archivos .zip
trimmomatic	Herramienta para el recorte de secuencias de ADN
fastqc	Programa para el control de calidad de datos de secuencias de alto rendimiento
wget	Herramienta de línea de comandos para descargar archivos de la web
spades	Ensamblador de genomas de lectura corta, de novo.
python3	Lenguaje de programación Python, versión 3.

*Continúa en la siguiente página*

Herramienta / dependencia	Descripción
build-essential	Conjunto de herramientas de desarrollo, incluyendo el compilador GCC y las bibliotecas necesarias
Nextflow	Framework para la creación y ejecución de flujos de trabajo bioinformáticos.
SRA Toolkit	Conjunto de herramientas para descargar y manejar datos de secuencias SRA de NCBI.
Bowtie2	Alineador de secuencias para la lecturas de ADN cortas.
Kraken2	Sistema de clasificación y análisis taxonómico de secuencias.
ncbi-blast+	Herramientas para realizar búsquedas de alineamiento de secuencias.
HMMER	Software para la detección de homologías en secuencias biológicas.
R	Lenguaje de programación y entorno para análisis estadístico y gráficos.
libcurl4-openssl-dev	Biblioteca de desarrollo para <i>curl</i> con soporte para OpenSSL.
libssl-dev	Biblioteca de desarrollo para OpenSSL, necesario para conexiones seguras.
libxml2-dev	Biblioteca de desarrollo para XML.
devtools (R)	Paquete de R para facilitar el desarrollo de paquetes de R.

*Continúa en la siguiente página*

Herramienta / dependencia	Descripción
XML (R)	Paquete de R para trabajar con datos XML.
rentrez	Paquete de R para interactuar con las bases de datos de NCBI.
autoconf	Herramienta para generar scripts de configuración automática.
git	Sistema de control de versiones.
VCFtools	Conjunto de herramientas para trabajar con archivos VCF (Variant Call Format).
BWA	Alineador de secuencias para lecturas cortas.
libvcflib-tools	Herramientas para manipular archivos VCF.
libvcflib-dev	Biblioteca de desarrollo para libvcflib-tools.
freebayes	Detector de variantes genéticas de múltiples muestras.
vcfR (R)	Paquete de R para la manipulación y análisis de archivos VCF.
bcftools	Conjunto de herramientas para trabajar con archivos VCF y BCF.
libdatetime-perl	Módulo de Perl para trabajar con fechas y horas.
libxml-simple-perl	Módulo de Perl para leer y escribir archivos XML.
libdigest-md5-perl	Módulo de Perl para crear resúmenes MD5.

*Continúa en la siguiente página*

Herramienta / dependencia	Descripción
default-jre	Entorno de ejecución de Java por defecto.
bioperl	Colección de módulos Perl para bioinformática.
Bio::Perl	Módulo de Perl para secuencias biológicas.
libidn11	Biblioteca para el manejo de nombres de dominio internacionalizados.
gzip	Herramienta de compresión de archivos.
libjson-perl	Módulo de Perl para trabajar con datos JSON.
libtext-csv-perl	Módulo de Perl para manipular archivos CSV.
libpath-tiny-perl	Módulo de Perl para manipular rutas de archivos.
liblwp-protocol-https-perl	Módulo de Perl para hacer solicitudes HTTP seguras.
libwww-perl	Módulo de Perl para interactuar con la web.
cpanminus	Instalador de módulos Perl.
LWP::Simple (Perl)	Módulo de Perl para hacer solicitudes HTTP sencillas.
any2fasta	Herramienta para convertir secuencias biológicas a formato FASTA.
Abricate	Herramienta para la detección de elementos genéticos en secuencias.

*Continúa en la siguiente página*

Herramienta / dependencia	Descripción
<code>rmarkdown</code>	Paquete de R que permite la creación de documentos dinámicos, informes y presentaciones combinando código R con texto narrativo.
<code>knitr</code>	Paquete de R que facilita la integración de código R en documentos de varios formatos.
<code>tinytex</code>	Paquete de R que proporciona una instalación ligera y portátil del sistema TeX Live.
<code>texlive-full</code>	Distribución completa de LaTeX .
<code>texlive-latex-extra</code>	Conjunto adicional de paquetes y clases LaTeX q.
<code>texlive-xetex</code>	Incluye XeTeX, un motor de LaTeX que soporta directamente Unicode y fuentes modernas.
<code>pandoc</code>	Herramienta de conversión de documentos.

En el caso de la instalación de Nextflow, SRA Toolkit se instalaron descargando los scripts de instalación y moviéndose al directorio `/usr/local/bin`. En el caso de Bowtie2, Kraken 2 y Abricate, se descargaron desde GitHub, y se instalaron manualmente añadiendo el binario al path. Por otra parte, HMMER, VCFtools y BWA, se descargaron y se instalaron desde la fuente. Los módulos de BioPerl y Perl se instalaron usando `cpan` y `cpanminus`. Los diferentes paquetes de R y R, se instalaron `devtools`, XML, `vcfR` desde CRAN y `rentrez` desde Github.

De esta manera, se garantiza la capacidad del flujo de trabajo de ser portable y reproducible en diferentes ambientes, con el único requerimiento de tener Docker.

## 7. Discusión

La búsqueda bibliográfica permitió identificar diferentes herramientas que permiten una correcta ejecución del flujo de trabajo del grupo seleccionado para la identificación de genes de resistencia antibiótica, se tuvo dificultades para instalar y ejecutar la gran mayoría de las opciones. La documentación, reflejaba una instalación basada en contenedor, lo que dificulta la instalación del ejecutable en nuestro propio ambiente de ejecución. Es por lo anterior, que se prefirió la utilización de un software que utiliza las bases de datos para la comparación como Resfinder o de NCBI para generar la identificación y anotación de los genes.

El diseño del flujo de trabajo, no presenta la posibilidad de seleccionar la herramienta a usar para los análisis, si no que por el contrario, existen herramientas predefinidas, detrás de la activación de la funcionalidad del usuario. Aquí, nace la posibilidad de evaluar si en futuras versiones, darle la cualidad al usuario de seleccionar la herramienta a usar por análisis mejoraría la usabilidad y rendimiento del flujo de trabajo.

El diseño actual, presente en este trabajo brinda la posibilidad de ejecutar diferentes análisis, con el único objetivo de mejorar la automatización de diversas herramientas bioinformáticas, sin duda, el servicio de este flujo de trabajo puede ser un instrumento potencialmente favorable para su utilización en investigaciones. De lo anterior, nace la problemática de seguir mejorando la automatización, optimizando el código, encontrando nuevas funcionalidad que vayan escalando junto al lenguaje de Nextflow.

Dentro del flujo de trabajo se optó por agregar diferentes funcionalidades que le ofrezcan al usuario una mejor “calidad de vida” y una mayor automatización, como la descarga de genomas de referencia, la utilización de SRA Toolkit para la descarga de las muestras en formato .fastq, la posibilidad de descomprimir directamente los archivos desde el flujo de trabajo o como también la descarga de las bases de datos para el análisis taxonómico. Sin duda, ninguna de estas funcionalidades intenta aumentar el tamaño de la imagen de docker, o disminuir el rendimiento, se tendrá que evaluar la usabilidad de cada una de estas características.

Una de las funcionalidades más importantes, es la implementación de un reporte final automatizado, que brinda la posibilidad al usuario de obtener la información de los procesos ejecutados de manera resumida. Sin duda, la implementación marcó un desafío, ya que, el lenguaje base del flujo de trabajo está escrito en Nextflow. Este lenguaje no brinda la

funcionalidad de ejecutar otro proceso terminado el flujo de trabajo principal, que serían todos los procesos seleccionados por el usuario. De esta manera, se tuvo que generar un canal para generar una dependencia y que reciba los resultados de cada proceso ejecutado y así detectar el momento en que los procesos del “flujo principal” terminen. Esta manera de detectar cuándo ejecutar el proceso que realiza el informe, sin duda, marca una lentitud en el rendimiento general y puede ser mejorada con alguna actualización de Nextflow futura.

La ejecución de los casos de estudios, se realizaron bajo un ambiente de bajo rendimiento, en un computador con 7 GB de RAM lo cual limitó nuestra capacidad de procesamiento de datos. Las restricciones de memoria afectaron significativamente la capacidad para ejecutar herramientas bioinformáticas intensivas en recursos como Kraken 2 y Spades de manera eficiente. Para manejar estas limitaciones, utilizamos varias estrategias. Ocupamos versiones más ligeras de las bases de datos y ejecutamos los análisis en fragmentos más pequeños de datos en lugar de analizar muestras completas de una vez. Lo cual, se puede observar, en la base de datos utilizada en el proceso de identificación taxonómica donde se utilizó la colección de muestras virales de un tamaño de 0.5 GB . Otro ejemplo claro, es la utilización de las primeras 500 lecturas de *Escherichia coli* y no el genoma de la muestra completo. Además, se implementaron técnicas de optimización de memoria, como la liberación de caché y el uso de datos comprimidos que permitieron completar los análisis, pero también presentaron desafíos, como tiempos de ejecución prolongados y la necesidad de realizar múltiples repeticiones para verificar los resultados. Es por esto, que para futuros usos, se recomienda el uso de sistemas con mayor capacidad de memoria acelerando los tiempos de análisis, y brindando la opción de usar datos de entrada más grandes. Es decir, las limitaciones de hardware presentaron desafíos significativos, y que si no es por las estrategias o adaptaciones, no se hubieran llevado a cabo. Sin embargo, mejorar los recursos computacionales es esencial para optimizar futuros estudios en análisis bioinformáticos y genómica bacteriana.

La documentación del flujo de trabajo en Github, está estructurada de forma que tiene secciones bien definidas que guían al usuario desde la instalación inicial, la configuración hasta la ejecución completa del pipeline. Cada sección incluye una descripción que ayuda a los usuarios a comprender no sólo el cómo funcionan si no que también el por qué detrás de cada etapa. Sin embargo, es claro mencionar que algunas secciones podrían mejorar su claridad con ejemplos más elaborados, y explicaciones adicionales.

Es importante que la documentación se mantenga actualizada con cualquier cambio del

flujo de trabajo, o del repositorio. Así mismo, al usar Github, existe la posibilidad de abrir issues y discusiones en el repositorio lo que permite que los usuarios puedan colaborar tanto en la mejora de la documentación como en el flujo.

El empaquetamiento del flujo de trabajo, permite poder garantizar la reproducibilidad sin importar el ambiente de ejecución del usuario, sin embargo, es necesario seguir mejorando y optimizando la imagen final a utilizar. En el caso de que en el trabajo futuro se agreguen más herramientas y dependencias, se hace imprescindible la necesidad de tener una imagen base más liviana. El flujo de trabajo actual, utiliza la última versión de ubuntu hasta la fecha, esto permite tener más facilidad al tener una gama de dependencias base más amplia pero con la consecuencia de un mayor peso neto en la descarga.



## 8. Conclusión

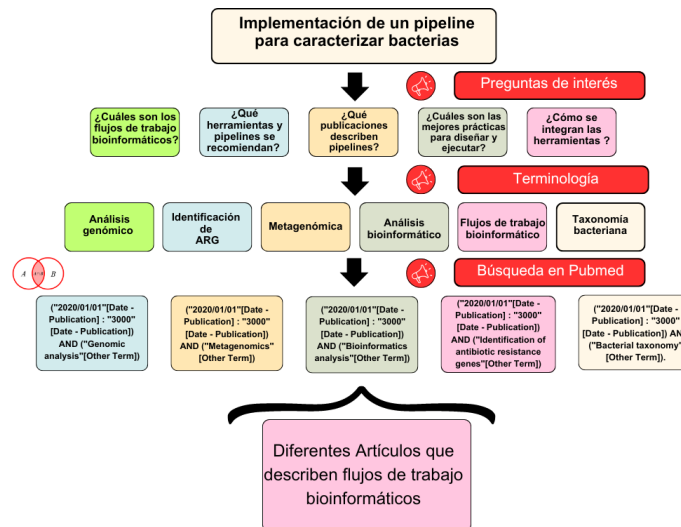
Los flujos de trabajo automatizados, reducen el tiempo necesario para realizar análisis y permite al investigador enfocarse, concentrarse en la interpretación de los resultados. De esta manera, optimizando el uso de recursos computacionales y el capital humano. En investigaciones que requieren análisis rápidos, la utilización de flujos de trabajo permite obtener una visualización general del panorama a investigar. Sin embargo, es importante destacar la capacidad dinámica y versátil de las herramientas bioinformáticas, las cuales ofrecen una gran flexibilidad para adaptarse a diferentes necesidades y contextos de investigación. Ofreciendo una mayor capacidad, cuando se tiene un mayor conocimiento sobre la herramienta.

El diseño del flujo de trabajo actual, permite poder escalar fácilmente para manejar un mayor conjunto de herramientas o para manejar grandes volúmenes de datos. Lo anterior, es especialmente importante en estudios de área de la genómica bacteriana, donde se pueden realizar múltiples muestras simultáneamente. Es decir, la capacidad de integrar diversas herramientas bioinformáticas dentro de un único flujo de trabajo permite un análisis más completo y detallado donde puede adaptarse y personalizarse para satisfacer necesidades específicas de diferentes contextos.

La documentación detallada, que abarca desde la instalación hasta ejemplos de uso, facilita la utilización de flujos de trabajo por parte de investigadores con diferentes niveles de experiencia en bioinformática. Esto permite a la comunidad contribuir a la mejora continua de estos flujos de trabajo mediante la actualización de herramientas y la incorporación de nuevas metodologías a través de solicitudes de cambio en GitHub. De esta manera, se asegura que los flujos de trabajo se mantengan al día con los avances tecnológicos, así como la corrección de errores y la implementación de mejoras en la calidad de vida.

## 9. Anexos

### 9.1. Anexo 1: Metodología para la búsqueda bibliográfica *elaboración propia*.



**Figura 6:** Metodología utilizada en la búsqueda bibliográfica (*elaboración propia*).

## 9.2. Anexo 2: Resultados del análisis taxonómico del caso de estudio *elaboración propia*.

**Tabla 10:** Información de cobertura, lecturas, puntos de ruptura, y taxonomía (elaboración propia).

Cobertura (%)	N° de lecturas	N° Puntos de ruptura	ID Taxón	Rango	Taxonomía
94.87	37	37	U	0	unclassified
5.13	2	0	1	root	root
5.13	2	0	10239		Viruses
5.13	2	0	2731341	1	Duplodnaviria
5.13	2	0	2731360	K	Heunggongvirae
5.13	2	0	2731618	P	Uroviricota
5.13	2	0	2731619	C	Caudoviricetes
2.56	1	0	2946167	F	Peduvoviridae
2.56	1	0	2948951	G	Wadgaonvirus
2.56	1	0	2956672	S	Wadgaonvirus wv5004651
2.56	1	1	2716351	S1	Escherichia phage 500465-1
2.56	1	0	2843442	G	Radostvirus
2.56	1	0	2844247	S	Radostvirus ev099
2.56	1	1	2847061	S1	Escherichia phage ev099

### 9.3. Anexo 3: Resultados de la anotación funcional del caso de estudio *elaboración propia*.

**Tabla 11:** Resultados de la anotación funcional (elaboración propia).

ORF	Rango de Nucleótidos	Descripción del Producto Proteico	Resultados BLAST
ORF1	553-642	unnamed protein product	0 hits found
ORF2	113-673	unnamed protein product	0 hits found
ORF3	686-787	unnamed protein product, partial	0 hits found
ORF4	432-539	unnamed protein product	0 hits found
ORF5	402-232	unnamed protein product	0 hits found
ORF6	554-429	unnamed protein product	0 hits found
ORF7	571-47	unnamed protein product	0 hits found

#### 9.4. Anexo 4: Resultados del análisis de llamado de variantes *elaboración propia*.

**Tabla 12:** Resultados del análisis de llamado de variantes (elaboración propia).

Categoría	ID	Descripción	Valor
Número de muestras	SN	number of samples	1
Número de registros	SN	number of records	90
Número de no-ALTs	SN	number of no-ALTs	0
Número de SNPs	SN	number of SNPs	90
Número de MNPs	SN	number of MNPs	0
Número de indels	SN	number of indels	0
Número de otros	SN	number of others	0
Sitios multialélicos	SN	number of multiallelic sites	0
Sitios multialélicos SNP	SN	number of multiallelic SNP sites	0
Transiciones (ts)	TSTV	number of transitions	61
Transversiones (tv)	TSTV	number of transversions	29
Ratio ts/tv	TSTV	transitions/transversions ratio	2.10
Conteo de alelos	SiS	allele count	1
Número de SNPs (SiS)	SiS	number of SNPs	90
Transiciones (SiS)	SiS	number of transitions	61
Transversiones (SiS)	SiS	number of transversions	29
Número de indels (SiS)	SiS	number of indels	0
Consistente con repetición	SiS	repeat-consistent	0
Inconsistente con repetición	SiS	repeat-inconsistent	0
No aplicable (SiS)	SiS	not applicable	0
Frecuencia de alelo	AF	allele frequency	0.000000
Número de SNPs (AF)	AF	number of SNPs	90
Transiciones (AF)	AF	number of transitions	61
Transversiones (AF)	AF	number of transversions	29
Número de indels (AF)	AF	number of indels	0
Calidad media	QUAL	Quality	30.4
<i>Continúa en la siguiente página</i>			

<b>Categoría</b>	<b>ID</b>	<b>Descripción</b>	<b>Valor</b>
Número de SNPs (QUAL)	QUAL	number of SNPs	90
Transiciones (QUAL)	QUAL	number of transitions (1st ALT)	61
Transversiones (QUAL)	QUAL	number of transversions (1st ALT)	29
Tipos de Sustitución	ST	$A > C$	9
Tipos de Sustitución	ST	$A > G$	13
Tipos de Sustitución	ST	$A > T$	4
Tipos de Sustitución	ST	$C > A$	1
Tipos de Sustitución	ST	$C > G$	2
Tipos de Sustitución	ST	$C > T$	17
Tipos de Sustitución	ST	$G > A$	13
Tipos de Sustitución	ST	$G > C$	2
Tipos de Sustitución	ST	$G > T$	2
Tipos de Sustitución	ST	$T > A$	6
Tipos de Sustitución	ST	$T > C$	18
Tipos de Sustitución	ST	$T > G$	3

## Referencias

- [1] Arauco Alarcon, R. P. (2022). Desarrollo de un pipeline bioinformático que permite el ensamblaje y la anotación del genoma de la bacteria *Rickettsia asembonensis* (Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos). Asesor: Dr. E. R. Villanueva Talavera.
- [2] Lee, K., Kim, D.-W., & Cha, C.-J. (2021). Overview of bioinformatic methods for analysis of antibiotic resistome from genome and metagenome data. *Journal of Microbiology*, 59(3), 270-280 <https://doi.org/10.1007/s12275-021-0652-4>
- [3] Almutairi, H., Urbaniak, M. D., Bates, M. D., Jariyapan, N., Kwakye-Nuako, G., Thomaz-Soccol, V., Al-Salem, W. S., Dillon, R. J., Bates, P. A., & Gatherer, D. (s. f.). LGAAP: Leishmaniinae Genome Assembly and Annotation Pipeline. *Microbiology Resource Announcements*, 10(29), e00439-21. <https://doi.org/10.1128/MRA.00439-21>
- [4] Morán, A., & Morán, A. (2019, 20 junio). El uso del Big Data en la Ciencia — Dciencia. Dciencia — Blog de Ciencia Para Todos. <https://www.dciencia.es/el-uso-del-big-data-en-la-ciencia/>
- [5] PowerData - Especialistas en Gestión de Datos. (s. f.). <https://www.powerdata.es/#https://www.powerdata.es/contacto>
- [6] Secuenciación de alto rendimiento (Pirosecuenciación e Illumina). (2016, 4 noviembre). Conogasi. <https://conogasi.org/articulos/secuenciacion-de-alto-rendimiento-pirosecuenciacion-e-illumina/>
- [7] Cortés-López, N. G., Ordóñez-Baquera, P. L., & Domínguez-Viveros, J. (2020). Herramientas moleculares utilizadas para el análisis metagenómico. Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 11(4), 1150-1173. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i4.5202>
- [8] Hadad, A., Simonetti, F., Pocay, L., & Elias, W. (2011). Experiencias de desarrollo en tareas de procesamiento y gestión de datos en bioinformática. *Facultad de Ingeniería*, 20(31), 69-76.
- [9] Díez, A. G. (2023, 28 abril). Fichas DevOps: Comandos Unix - Autentia. Autentia. <https://www.autentia.com/2023/03/21/fichas-devops-comandos-unix/>
- [10] Bash Scripting - JavatPoint. (s. f.). [https://www.javatpoint-com.translate.goog/bash-scripting?\\_x\\_tr\\_sl=en&\\_x\\_tr\\_tl=es&\\_x\\_tr\\_hl=es&\\_x\\_tr\\_pto=sc](https://www.javatpoint-com.translate.goog/bash-scripting?_x_tr_sl=en&_x_tr_tl=es&_x_tr_hl=es&_x_tr_pto=sc)
- [11] Programación en Bash – Programación para la bioinformática. (s. f.). <https://blogs.upm.es/estudiaciencia/programacion-en-bash/>
- [12] Lomas Redondo, A. (2021). Creación de un pipeline para análisis de datos metagenómicos basado en Nextflow. Universitat Politècnica de València. <http://hdl.handle.net/10251/171195>

- [13] Technologies, V. (s. f.). What is Containerization? What are the Benefits? <https://www.veritas.com/es/mx/information-center/containerization>
- [14] ¿Qué es Docker? — IBM. (s. f.). <https://www.ibm.com/mx-es/topics/docker>
- [15] ¿Qué es Docker y cómo funciona? Ventajas de los contenedores Docker. (s. f.). <https://www.redhat.com/es/topics/containers/what-is-docker>
- [16] Yan, Y., Li, H., Fayyaz, A., & Gai, Y. (2022). Metagenomic and network analysis revealed wide distribution of antibiotic resistance genes in monkey gut microbiota. *Microbiological Research*, 254, 126895. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126895>
- [17] Duarte, G. T., Volkova, P. Yu., & Geras'kin, S. A. (2021). A Pipeline for Non-model Organisms for de novo Transcriptome Assembly, Annotation, and Gene Ontology Analysis Using Open Tools: Case Study with Scots Pine. *Bio-protocol*, 11(3), e3912 <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3912>