

Assessing the properties of asymptotic PERMANOVA test through comprehensive simulations in the context of genetic studies



Universitat Oberta
de Catalunya

Aitor Invernón de Campos

Análisis de datos Ómicos

Máster universitario de Bioinformática y
Bioestadística (UOC, UB)

Miquel Calvo Llorca
Diego Garrido-Martín

David Merino Arranz

12/10/2023



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



Assessing the properties of asymptotic PERMANOVA test through comprehensive simulations in the context of genetic studies ©2023 by **Aitor Invernón de Campos** is licensed under Attribution 4.0 International.

To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Ficha Del Trabajo Final

Título del trabajo:	Assessing the properties of asymptotic PERMANOVA test through comprehensive simulations in the context of genetic studies
Nombre del autor/a:	Aitor Invernón de Campos
Nombre del tutor/a de TF:	Miquel Calvo Llorca Diego Garrido-Martín
Nombre del/de la PRA:	David Merino Arranz
Fecha de entrega:	12/10/2023
Titulación o programa:	Máster universitario de Bioinformática y Bioestadística (UOC, UB)
Área del trabajo final:	Análisis de datos Ómicos
Idioma del trabajo:	Castellano
Palabras clave:	Multivariate statistics; MANOVA; PERMANOVA; asymptotics; distance measure; quadratic forms; experimental design; partitioning; permutation tests; canonical analysis; resampling; GWAS; RNA-Seq; sQTLs

Resumen del trabajo

Este será mi resumen.

Abstract

This will be my abstract.

Índice general

Índice general	1
Índice de figuras	2
Índice de tablas	3
1 Introducción	5
1.1 Contexto y justificación del trabajo	5
1.2 Objetivos del trabajo	7
1.3 Enfoque y método seguido	8
1.4 Planificación del trabajo	9
1.5 Hitos	10
1.6 Análisis de riesgos	11
1.7 Breve resumen de productos obtenidos	11
1.8 Descripción de otros capítulos	11
2 Estado del arte	12
2.1 Contexto biotecnológico	12
2.2 Estadística multivariante aplicada a estudios <i>GWAS</i> basados en datos <i>RNA-seq</i>	15
2.2.1 Métodos primarios univariantes	15
2.2.2 Evolución de los métodos multivariantes y sus estrategias de aplicación	16
2.2.3 MANTA - Implementación de la versión asintótica y no paramétrica de <i>PERMANOVA</i>	17
3 Resultados	18
4 Discusión	19
5 Conclusiones y trabajos futuros	20
5.1 Conclusiones	20
5.2 Líneas de futuro	20
5.3 Seguimiento de la planificación	20
Glosario	21
Referencias	23

Índice de figuras

1.1	Planificación orientativa de las tareas a realizar para la consecución de la memoria y presentación del presente TFM: (<i>supra</i>) desglose de los diferentes objetivos y tareas propuestas; (<i>infra</i>) diagrama Gantt correspondiente.	9
-----	--	---

Índice de tablas

Índice de Ecuaciones

Capítulo 1

Introducción

1.1. Contexto y justificación del trabajo

El tema escogido para la realización del TFM se enmarca en el análisis de datos ómicos mediante el uso de la *estadística multivariante*, principalmente la versión asintótica de **PERMANOVA**, aplicada al estudio de asociaciones entre los polimorfismos de un solo nucleótido (*SNPs*) del genoma completo (estudios tipo *GWAS*) y algunos rasgos característicos, como son las principales enfermedades humanas, así como en la detección de *sQTLs* utilizando datos *RNA-seq*.

Originalmente, las investigaciones basadas en *GWAS*, ya sea integrando *sQTLs* o no, se han realizado con la finalidad de comprobar la asociación entre los *SNPs* con diferentes variantes genéticas mediante el estudio de un único rasgo (única variable o *trait*), con lo que los análisis estadísticos correspondientes llevados a cabo suelen utilizar, lógicamente, los principales métodos univariantes disponibles (sumario estadístico basado en tablas de distribución de frecuencias, estadísticos de centralización o dispersión, etc.).

De este modo, este tipo de estudios, al centrarse en un solo *trait* de todos los disponibles en el gran volumen de datos sobre fenotipos utilizable, no permiten tratar la posible relación causa-efecto subyacente, obteniendo un análisis meramente descriptivo.

Alternativamente, gracias a la gran cantidad de datos disponibles últimamente con perfiles genómicos complejos (alta diversidad de rasgos moleculares), la necesidad de encontrar correlaciones entre las diferentes variables analizables y los rasgos de interés, ha resultado en un crecimiento en la utilización de métodos multivariantes para su análisis estadístico.

Las principales ventajas con respecto al enfoque univariante clásico, para poder determinar la posible estructura de correlaciones subyacente en los datos, pueden enumerarse como sigue:

- Mayor potencia estadística para detectar asociaciones genéticas.
- Ofrece ventajas en el estudio de la *pleiotropía* (cuando el gen o alelo considerado es responsable de efectos fenotípicos o caracteres distintos y, a priori, no relacionados).
- Resulta de utilidad incluso cuando solo un pequeño grupo de los rasgos se ve afectado por el genotipo de interés.

- Permite el análisis a través de múltiples capas fenotípicas en bloque, dando luz sobre los mecanismos moleculares activados por las variantes genéticas consideradas.
- Posibilita la caracterización de los efectos genéticos sobre un mismo rasgo cuando este es medido en diferentes condiciones ambientales o entornos.
- Requiere de menos pruebas individuales, lo que disminuye las de carácter múltiple.

Contrariamente, del uso de los métodos más habitualmente utilizados para estudiar estas asociaciones genéticas multirasgo emergen diversos inconvenientes, entre los cuales destacan:

- Los métodos que modelan el genotipo como variable dependiente comprobando a su vez la asociación con una suma ponderada de fenotipos (*MV-PLINK* ([1]) o análisis de correlación canónica, y *MultiPhen* [2] que utiliza la regresión ordinal) adolecen de la posibilidad de evaluar diseños complejos que presentan múltiples interacciones entre el genotipo y otras covariables.
- Tanto el análisis multivariante de la varianza (*MANOVA*), como el de los modelos multivariantes lineales mixtos (*mvLMMs*) [3], resultan ser más tolerantes a estos diseños complejos al tratar los fenotipos como variables dependientes, introduciendo de forma natural el posible parentesco genético entre los individuos analizados. Esta ventaja se torna inconveniente para grandes conjuntos de datos, sobre todo para el método *mvLMMs*, cuya continua mejora en su implementación computacional sigue requiriendo de tiempos excesivamente altos.
- La pluralidad de los métodos de regresión multivariante presuponen una normalidad en la distribución de los errores del modelo que puede no llegar a cumplirse. Todo y que pueden aplicarse transformaciones individuales a cada rasgo estudiado, no puede garantizarse la normalidad multivariante, lo que resulta en una reducción de la potencia estadística en comparación con el modelo aplicado a los rasgos no transformados.
- Hasta el momento, las diversas implementaciones de *métodos bayesianos* para el estudio de asociaciones multirasgo no han sido satisfactorias, requiriendo siempre un tiempo elevado de cálculo debido al coste computacional que implican.
- Para los métodos *MTAR* [4] o *MOSTest* [5] [6] existe la necesidad de garantizar la normalidad multivariante asintótica cuando se utilizan los sumarios estadísticos univariantes, lo que no es trivial, sumado a que evitar la aparición de sesgos en la estimación de correlaciones de rasgos a partir de esta clase de estadísticos no es sencillo (afectaciones de heredabilidad de los rasgos, patrones de desequilibrio de ligamiento, etc.).

Con todo lo anterior, resulta evidente la necesidad de disponer de un método no paramétrico adecuado tanto para los estudios basados en (*GWAS*) como en *sQTLs*. El modelo de *PERMANOVA* ([7]) amplía el modelo lineal factorial univariante a múltiples dimensiones sin requerir una distribución de probabilidad conocida de las variables dependientes, introduciendo un enfoque basado en la distancia, poniendo a prueba la hipótesis de ausencia de efectos mediante un procedimiento de permutación basado en un estadístico *pseudo-F*, en el que las sumas de cuadrados del *ANOVA* se sustituyen por sumas de interdistancias entre observaciones.

Pese a ser exitoso en muchos estudios, dando buenos resultados en un tiempo de cálculo reducido para diseños fijos unidireccionales, resulta inviable en los estudios actuales, donde el mayor tamaño y complejidad de los conjuntos de datos requiere una precisión para el cálculo del valor *p* que este procedimiento permutacional no puede alcanzar en las condiciones requeridas.

El punto de partida del presente trabajo radica en los diversos estudios realizados con el fin de superar esta limitación. En concreto: sendos artículos de Garrido-Martín, D. *et al.* ([8] y [9]), y el trabajo de Monlong, J. *et al.* [10]. Donde, gracias al programa *MANTA* ([11], desarrollado principalmente en R), se estudia mediante diversas simulaciones ([12]) de diseños complejos la distribución asintótica de la estadística de pruebas *PERMANOVA* en el caso de la distancia euclídea (*valores p* de carácter no paramétrico y asintótico para modelos lineales multivariados), obteniendo resultados igualmente válidos tras cualquier transformación de los datos que preserve la independencia de las observaciones.

La finalidad principal será ahondar en estos estudios, yendo más allá en al menos los siguientes aspectos:

- Estudiar las propiedades de *MANTA* en algunos escenarios, determinando cómo los diferentes tipos de transformaciones de datos afectan a los resultados obtenidos, y dilucidar si existe algún protocolo privilegiado en las simulaciones implementadas.
- Estudiar la pérdida de potencia de la versión asintótica de *PERMANOVA* con respecto a *MANOVA* y otros métodos, profundizando en la afectación de la variación del nivel de significación considerado sobre la potencia de cada uno.
- Comparar los resultados obtenidos con respecto al cálculo de la distribución de las formas cuadráticas entre el método Farebrother (implementado para la versión asintótica de *PERMANOVA* con *MANTA*) y el de Saddlepoint.
- Extender el punto anterior, ampliando la comparativa Farebrother vs. Saddlepoint a otros métodos: métodos exactos como el de Davies, R. B. ([13], [14]), o aproximaciones numéricas como la de Liu–Tang–Zhang ([15]), el método de Imhof, etc.
- Partiendo del caso de estudio anterior, y secundariamente, se llevaría a cabo la implementación del método más óptimo en el paquete *MANTA* ya existente, en caso de que este exista.

1.2. Objetivos del trabajo

Siguiendo las pautas del punto anterior, este TFM consistirá en un trabajo principalmente teórico, en el cual se profundizará en aspectos concretos de los estudios ya referenciados ([8], [9]), [10]), con el objetivo de determinar la validez de la versión asintótica del método *PERMANOVA* (implementado en el paquete *MANTA*) con respecto a otros métodos similares bajo un mismo conjunto de simulaciones complejas basadas en datos de escenarios reales.

Para tal efecto se han considerado, al menos, tres objetivos principales:

- Estudiar las propiedades de *MANTA* en algunos escenarios, determinando cómo los diferentes tipos de transformaciones de datos afectan a los resultados obtenidos, y dilucidar si existe algún protocolo privilegiado en las simulaciones implementadas.
- Estudiar la pérdida de potencia de la versión asintótica de *PERMANOVA* con respecto a *MANOVA* y otros métodos, profundizando en la afectación de la variación del nivel de significación considerado sobre la potencia de cada uno.
- Comparar los resultados obtenidos con respecto al cálculo de la distribución de las formas cuadráticas entre el método Farebrother (implementado para la versión asintótica de *PERMANOVA* con *MANTA*) y el de Saddlepoint.

Y los siguientes objetivos secundarios:

- Extender el punto anterior, ampliando la comparativa Farebrother vs. Saddlepoint a otros métodos: métodos exactos como el de Davies, R. B. ([13], [14]), o aproximaciones numéricas como la de Liu–Tang–Zhang ([15]), el método de Imhof, etc.
- Partiendo del caso de estudio anterior, y secundariamente, se llevaría a cabo la implementación del método más óptimo en el paquete *MANTA* ya existente, en caso de que este exista.

1.3. Enfoque y método seguido

En cuanto al tiempo de dedicación, se ha enfocado el trabajo siguiendo las pautas marcadas por las diferentes entregas programadas por la UOC (*Pruebas de Evaluación Continua* o *PEC*), estableciendo los siguientes bloques de trabajo:

- **Primera entrega:** *PEC1 - Definición y plan de trabajo* (10 % de dedicación).
- **Segunda entrega:** *PEC2 - Desarrollo del trabajo - Fase 1* (35 % de dedicación).
- **Tercera entrega:** *PEC3 - Desarrollo del trabajo - Fase 2* (35 % de dedicación).
- **Cuarta entrega:** *PEC4 - Cierre de la memoria y de la presentación* (15 % de dedicación).
- **Defensa pública** (5 % de dedicación).

Se puede encontrar una planificación más detallada en la sección [Planificación del trabajo](#).

1.4. Planificación del trabajo

Una planificación orientativa de las tareas que conforman cada bloque de trabajo específico, en parte basada en la estructura de las diferentes PEC a entregar, puede encontrarse en 1.1.

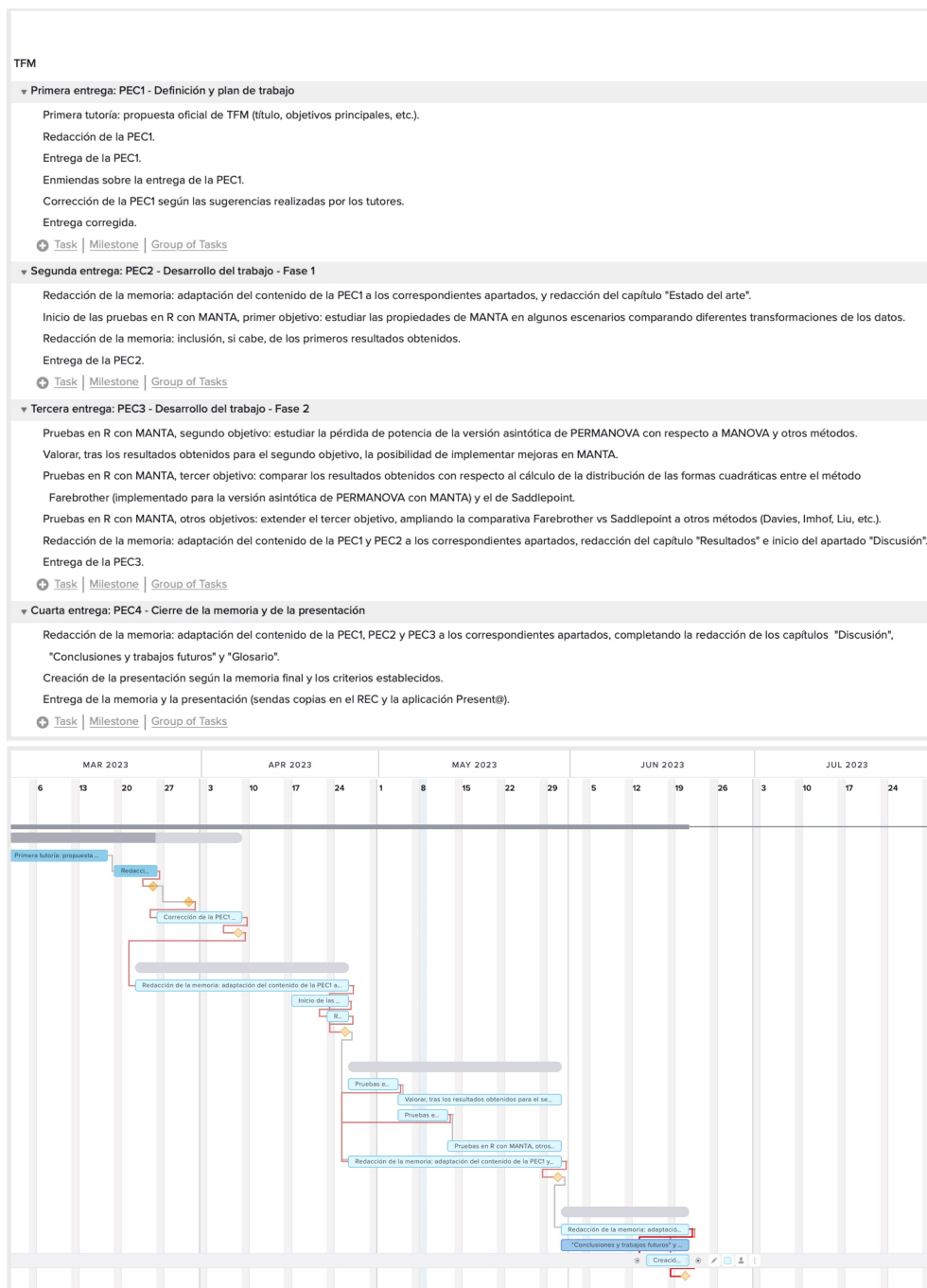


Figura 1.1: Planificación orientativa de las tareas a realizar para la consecución de la memoria y presentación del presente TFM: (*supra*) desglose de los diferentes objetivos y tareas propuestas; (*infra*) diagrama Gantt correspondiente.




1.5. Hitos

A continuación se muestran las distintas fases del proyecto según su compleción, indicando los posibles retrasos o problemas inesperados o no que, al surgir, pueden haber puesto en riesgo la consecución de las tareas previstas, y los objetivos establecidos:

☒ **Primera entrega:** *PEC1 - Definición y plan de trabajo*

- ☒ Primera tutoría: propuesta oficial de TFM (título, objetivos principales, etc.).
- ☒ Redacción y entrega de la PEC1.
- ☒ Enmiendas sobre la entrega de la PEC1 basadas en las sugerencias realizadas por los tutores.
- ☒ Versión final de la primera entrega corregida.

Segunda entrega: *PEC2 - Desarrollo del trabajo - Fase 1*

- ☒ Redacción de la memoria: adaptación del contenido de la *PEC1* a los correspondientes apartados.
-  Redacción del capítulo *Estado del arte*.
-  Inicio de las pruebas en *R* con *MANTA*, primer objetivo: estudiar las propiedades de *MANTA* en algunos escenarios comparando diferentes transformaciones de los datos.
- ☒ Redacción de la memoria: inclusión, si cabe, de los primeros resultados obtenidos.
-  Entrega de la *PEC2*.

☐ **Tercera entrega:** *PEC3 - Desarrollo del trabajo - Fase 2*

- ☐ Pruebas en *R* con *MANTA*, segundo objetivo: estudiar la pérdida de potencia de la versión asintótica de *PERMANOVA* con respecto a *MANOVA* y otros métodos.
- ☐ Valorar, tras los resultados obtenidos para el segundo objetivo, la posibilidad de implementar mejoras en *MANTA*.
- ☐ Pruebas en *R* con *MANTA*, tercer objetivo: comparar los resultados obtenidos con respecto al cálculo de la distribución de las formas cuadráticas entre el método *Farebrother* (implementado para la versión asintótica de *PERMANOVA* con *MANTA*) y el de *Saddlepoint*.
- ☐ Pruebas en *R* con *MANTA*, otros objetivos: extender el tercer objetivo, ampliando la comparativa *Farebrother* vs. *Saddlepoint* a otros métodos (*Davies*, *Imhof*, *Liu*, etc.).
- ☐ Redacción de la memoria: adaptación del contenido de la *PEC1* y *PEC2* a los correspondientes apartados, redacción del capítulo *Resultados* e inicio del apartado *Discusión*.
- ☐ Entrega de la *PEC3*.

☐ **Cuarta entrega:** *PEC4 - Cierre de la memoria y de la presentación*

- ☐ Redacción de la memoria: adaptación del contenido de la *PEC1*, *PEC2* y *PEC3* a los correspondientes apartados, completando la redacción de los capítulos *Discusión*, *Conclusiones y trabajos futuros* y *Glosario*.
- ☐ Creación de la presentación según la memoria final y los criterios establecidos.
- ☐ Entrega de la memoria y la presentación (sendas copias en el *REC* y la aplicación *Present@*).

1.6. Análisis de riesgos

En esta sección se indicarán algunas de las contingencias que pudieran surgir durante la realización del proyecto, indicando, a su conclusión, si alguna de ellas ha impedido su apropiado avance o, incluso, la no consecución de alguno de los objetivos planteados:

- **Tiempo limitado:** debido a que el TFM debe realizarse en un solo cuatrimestre, el tiempo disponible para desarrollar el proyecto suele ser muy ajustado. Cualquier contratiempo o retraso en la planificación, ya sea predecible o no, puede afectar gravemente a la consecución de los plazos y, eventualmente, impedir alcanzar alguno de los objetivos que se han planteado. Ser capaz de maximizar la dedicación con el tiempo disponible, e identificar a tiempo los escollos que pueden atascar el proceso, serán claves para mitigar sus efectos.
- **Planificación incorrecta:** una posible mala priorización o asignación de tiempo a las tareas pertinentes puede influir de manera negativa en la consecución de los objetivos, sobre todo si existe dependencia de la tarea afectada por parte de alguna otra. También puede afectar de manera negativa una infravaloración de la dificultad de alguno de los objetivos propuestos, ya sea por el tiempo requerido para su consecución, o por falta de los conocimientos necesarios.
- **Etapas de análisis y pruebas:** en ella pueden surgir diversos contratiempos, como la dificultad en el manejo de los *scripts* de código que se pretenden utilizar, problemas inesperados con el computador utilizado, lentitud de los procesos ejecutados al tratar con grandes cantidades de datos, etc.

1.7. Breve sumario de productos obtenidos

- **Plan de trabajo:** documento donde se incluye una distribución de tareas según los objetivos determinados, puntos clave y tiempos necesarios (disponible en la sección [Planificación del trabajo](#)). Así mismo, también se incluye una valoración de los posibles riesgos que pudieran surgir a lo largo de la elaboración del proyecto.
- **Memoria:** producto derivado de todas las entregas parciales o *PEC* (basado en la estructura recomendada por la UOC), donde se detallará el contexto científico, los resultados obtenidos según el procedimiento seguido y, finalmente, las conclusiones extraídas tras su interpretación.
- **Producto:** aun sin ser un objetivo principal, puede llegar a obtenerse una iteración mejorada del programario utilizado ya existente.
- **Presentación virtual del TFM:** exposición oral y visual basada en la memoria producida. En ella se resaltarán los aspectos más importantes del trabajo realizado, presentando las distintas fases del proyecto de forma resumida.
- **Autoevaluación del proyecto:** documento que, una vez finalizado el proyecto, debe redactarse para plasmar una evaluación crítica del trabajo realizado, determinando el grado de alcance de los objetivos, y valorando los aspectos potencialmente mejorables.

1.8. Descripción de otros capítulos

En esta sección se realizará, en caso de ser necesario, una escueta descripción de los diversos capítulos de la memoria.

Capítulo 2

Estado del arte

2.1. Contexto biotecnológico

Aunque el presente trabajo es eminentemente teórico, centrándose en una comparativa de métodos estadísticos multivariantes específicos, aplicables a diversos campos de investigación, cabe destacar su aplicación biológica, en concreto, en la investigación genética avanzada.

Esta ha evolucionado enormemente en las últimas décadas gracias al desarrollo de nuevas tecnologías, permitiendo identificar variantes genéticas asociadas a una amplia variedad de fenotipos y rasgos. La secuenciación de nucleótidos que conforman la molécula de *ADN* permite el análisis detallado de su estructura, convirtiéndose en la herramienta idónea para identificar variantes en el material genético.

En los años 70, la *secuenciación Sanger* revolucionó la investigación originando la era genómica, la cual se ha asentado gracias a la evolución que ha sufrido este campo en los últimos años debido al desarrollo de las nuevas plataformas de secuenciación de alto rendimiento (*Next-Generation Sequencing* o *NGS*). Estas nuevas técnicas son capaces de generar paralelamente, y de forma masiva, millones de fragmentos de *ADN* en un único proceso de secuenciación, consiguiendo así el análisis de grandes cantidades de información genética en una escala inimaginable en los orígenes de esta disciplina [16, 17].

Recientemente, cada vez más investigaciones han empezado a decantarse por un tipo específico de secuenciación masiva: la *secuenciación de ARN* o *RNA-seq*. Dicha estrategia de análisis utiliza técnicas *NGS* para revelar la presencia y cantidad de *ARN* existente en una muestra biológica en un momento dado, lo cual le permite ser aplicada para analizar cambios en el transcriptoma. Algunos usos potenciales de esta técnica que cabe destacar son [18] [19]:

- Observación de transcritos resultantes del *empalme alternativo*, *modificación postranscripcional*, *fusiones génicas*, *mutaciones/polimorfismos de nucleótidos únicos* o *SNP* y *cambios de expresión de genes*.
- Caracterización de diferentes poblaciones de *ARN*: *miARN*, *tARN*, y *rARN*.
- Determinación de las *fronteras exón/intrón*
- Verificación y corrección de *regiones 5' y 3'*.

Pese a que la *RNA-seq* es similar a la *secuenciación de ADN*, existe una importante diferencia. En esta, se añade un paso más, de forma que en vez de aislar directamente el *ADN*, se extrae primero el *ARN* de la muestra transcribiéndolo seguidamente al revés para producir

cDNA, el cual se fragmenta y procesa mediante un sistema *NGS* de alto rendimiento. Cabe añadir que la alta reproducibilidad de esta tecnología y la reducción en la duración de todo el proceso, ya situado en menos de 24 horas (incluyendo el tiempo de preparación de la biblioteca, la secuenciación en sí, y el análisis bioinformático), la convierte en una de las estrategias de análisis genético más accesible y utilizada.

Gracias a estas técnicas de secuenciación masiva, los estudios de asociación del genoma completo (*GWAS*) han sido hasta ahora el enfoque prioritario en cuanto a los esfuerzos por identificar variantes genéticas asociadas con un fenotipo o rasgo particular. Esta estrategia analiza la variación genética en todo el genoma de un gran número de individuos para identificar regiones asociadas con el rasgo de interés, resultando especialmente útil en la identificación de variantes genéticas asociadas con enfermedades comunes y complejas, así como con rasgos específicos. En concreto, este tipo de estudios destacan por su eficiencia en los siguientes campos [20, 21, 15, 22, 23]:

- En la identificación de nuevas *asociaciones variante-rasgo*, estableciendo con éxito *loci* de riesgo para un gran número de enfermedades y rasgos. Aunque no pueden explicar toda la heredabilidad de los rasgos complejos, representan un medio práctico por el cual se pueden descubrir asociaciones genuinas. De forma que con el aumento del número de muestras *GWAS* se deberían seguir determinando nuevos *loci*.
- Los *GWAS* pueden conducir al descubrimiento de nuevos mecanismos biológicos. Los *loci GWAS* suelen implicar genes de función desconocida o que no se consideraban relevantes, cuyo seguimiento experimental puede conducir al descubrimiento de nuevos mecanismos biológicos subyacentes a las enfermedades.
- Tiene diversas aplicaciones clínicas, ya que las variantes genéticas descubiertas mediante *GWAS* pueden utilizarse para identificar a individuos con alto riesgo de padecer determinadas enfermedades, mejorando así la evolución de los pacientes mediante la detección precoz, la prevención o el tratamiento. Sus hallazgos pueden aplicarse a la clasificación y subtipificación de enfermedades.
- Pueden aportar información sobre la etnicidad de ciertos rasgos complejos, ya que se conoce que algunos *loci* de riesgo muestran considerables diferencias étnicas en frecuencia y/o tamaño del efecto.
- También son relevantes para el estudio de variantes raras y de baja frecuencia. En la actualidad, la mayor parte de este tipo de estudios se realizan utilizando datos obtenidos mediante *arrays de SNP* que, al incluir actualmente una mayor densidad de variantes y una gama más amplia de frecuencias alélicas, permiten genotipar directamente muchas variantes raras y de baja frecuencia. Las variantes raras y de baja frecuencia también pueden genotiparse utilizando matrices personalizadas centradas en exomas.
- Otras aplicaciones son: puede utilizarse para *identificar nuevos genes de enfermedades monogénicas y oligogénicas*, puede *estudiar variantes genéticas distintas de los SNV*, sus datos se utilizan para *múltiples aplicaciones más allá de la identificación de genes*, además, la *generación, gestión y análisis de datos GWAS son sencillos*, además, al ser fácilmente compartibles y de acceso público, *facilitan nuevos descubrimientos*.

Cabe destacar uno de estos puntos, ya que representa a la mayoría de los estudios tipo *GWAS* que se realizan hoy en día. Es el caso de las investigaciones que utilizan datos *GWAS* basados en *arrays de SNP*, que ofrecen unas ventajas particulares:

- **Utilizan una tecnología de genotipado muy precisa:** lo que es crucial para el éxito de cualquier estudio de asociación genética a gran escala, donde los sesgos sistemáticos inducidos por las fuentes de error (aunque sean pequeñas) pueden hacer crecer tanto los falsos positivos como negativos a la hora de determinar las *asociaciones variante-rasgo*. Concretamente, en la actualidad las *matrices SNP* de genoma completo contemporáneas alcanzan precisiones por encima del 99,7% y, además, se han desarrollado protocolos que determinan la utilización de solo aquellos datos que superen los umbrales de calidad para cada uno de los indicadores (*call rate*, concordancia de duplicados, consistencia mendeliana y prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg), establecidos de forma independiente para cada estudio, garantizando así la confianza en los resultados.

- **Rentabilidad (coste y tiempo) a la hora de identificar *loci de riesgo*:** es un método rentable ya que el coste del análisis de *matrices SNP* seguido de la *imputación de variantes hasta un MAF del 0,1 %* se ha ido reduciendo durante los últimos años de forma constante. Este hecho permite, hoy en día, explorar gran parte de la variación genética del genoma a un coste razonable incluso en muestras de gran tamaño.

Por otro lado, también presentan algunas limitaciones, entre las cuales se destacan las siguientes [20, 22, 23]:

- Estos estudios se ven altamente afectados por la necesidad de adoptar un alto nivel de significación para tener en cuenta las pruebas múltiples realizadas, lo que comúnmente se realiza usando una *corrección de Bonferroni* para mantener la tasa de falsos positivos en todo el genoma en un 5 % (basado en la suposición de 1×10^6 pruebas independientes para la variación genética común). Todo esto afecta a la *potencia* de esta técnica para detectar toda la hereditabilidad explicada por los *SNPs*, ya que las señales de asociación deberán alcanzar un umbral de $P < 5 \times 10^{-8}$ para ser consideradas significativas. Una estrategia útil en algunas ocasiones para superar esta limitación es aumentar el tamaño de la muestra; en otras ocasiones, reducir el número de pruebas realizadas (lo cual se logra utilizando pruebas de asociación basadas en genes o limitando los análisis a regiones genómicas candidatas) es lo más adecuado.
- Pese a haber identificado un número sin precedentes de variantes genéticas asociadas con enfermedades y rasgos comunes, sólo es capaz de explicar una pequeña parte de la heredabilidad estimada de los rasgos más complejos. Una probable explicación es que los *SNPs* que afectan moderadamente se pierden porque no alcanzan el estricto umbral de significación establecido. El aumento constante en los tamaños de muestras, así como la adopción de nuevos métodos y diseños de estudio, pueden ayudar a solventar dicho escollo.
- La correlación local de múltiples variantes genéticas debido al desequilibrio de enlace facilita la identificación inicial de un *locus* pero dificulta el discernimiento de la variante o variantes causales. Una vez que se ha realizado un *GWAS*, a menudo se requieren pasos adicionales para identificar las variantes causales y sus genes de destino. Los avances en los métodos estadísticos como los enfoques bayesianos, han permitido avanzar en la restricción de las posibles variantes causales. Además, el aumento de bases de datos de elementos reguladores en una variedad de tipos de tejidos y células, disponibles públicamente (ENCODE, Epigenome RoadMap, FANTOM5 y GTEx), así como herramientas para la consulta de dichos bancos de datos, ha permitido integrar los hallazgos de *GWAS* con datos de genómica funcional en múltiples niveles, priorizando las variantes candidatas para el seguimiento funcional.
- Otras limitaciones también son: que no se pueden identificar todos los determinantes genéticos de rasgos complejos; su poca fiabilidad en la detección de epistasis en humanos; que las señales analizadas pueden deberse a la estratificación criptica de la población; usualmente, tienen una capacidad predictiva clínica limitada.
- En cuanto a los *GWAS basados en arrays de SNP*, existen algunas limitaciones particulares:
 - Dependen de la integridad de los estudios de secuenciación y los paneles de referencia resultantes que se utilizan para informar al diseño de matriz de genotipado e imputar variantes no tipadas en *GWAS*. Las primeras configuraciones de SNP para todo el genoma fueron diseñados seleccionando *SNPs* de los paneles de referencia de poblaciones predominantemente europeas, generando así un sesgo, y eludiendo la influencia que la variación de los patrones de desequilibrio de enlace entre grupos étnicos pueda tener. De un tiempo a esta parte, se ha intentado solventar desarrollando una nueva generación de matrices de alta densidad cuyos contenidos se basan en datos de secuenciación de poblaciones más diversas. Sin embargo, muchos grupos étnicos todavía no han sido secuenciados.
 - Aunque la evidencia empírica sugiere que gran parte de la heredabilidad de los rasgos complejos puede explicarse por variantes comunes, también se considera que las variantes raras y ultra raras han de contribuir de alguna manera. En este contexto, es destacable el hecho que hoy en día los *GWAS basados en arrays de SNP* son incapaces de detectar variantes ultrararas asociadas con la enfermedad.

Por otro lado, en este tipo de estudios una proporción de las variantes descritas son *QTLs* (*eQTLs*, *trQTLs*, etc.), siendo de particular interés los *locus de rasgo cuantitativo de empalme* (*sQTLs*), los cuales regulan el empalme alternativo del *pre-ARNm*, y pueden ser detectados usando datos *RNA-seq* [24, 10]. De esta manera, la correcta integración del genoma secuenciado, los *QTLs* y el fenotipo celular, puede ayuda a comprender los genes causantes de ciertas enfermedades, las variantes genéticas causales que subyacen a los *GWAS* y los procesos biológicos que intervienen.

Un *locus de rasgo cuantitativo* (*QTL*) es una sección de ADN que se correlaciona con la variación de un rasgo cuantitativo en el fenotipo de una población de organismos. Estos pueden mapearse de manera que permitan identificar qué marcadores moleculares, *SNPs* o *Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados* (*AFLPs*), se correlacionan con un rasgo observado, lo que suele ser un primer paso en la secuenciación e identificación de los genes que realmente modulan la expresión génica.

Este mapeo permite descubrir regiones genómicas asociadas a la regulación de la transcripción de genes que pueden relacionarse con la variación fenotípica cuando se colocan con *QTLs* (efectos *cis* y *trans*), proporcionando una base molecular para la *asociación fenotipo-genotipo* [25, 26, 27].

2.2. Estadística multivariante aplicada a estudios *GWAS* basados en datos *RNA-seq*

El presente trabajo se encuentra contextualizado en la aplicación de la estadística multivariante en estudios *GWAS* de ciertas asociaciones *SNPs-Rasgos característicos*, integrando la influencia de los *sQTLs*, mediante el análisis de datos *RNA-seq*.

Para poder dar una visión suficientemente amplia de los métodos estadísticos aplicados a este tipo de estudios desde sus inicios a la actualidad, a continuación se pretende elaborar una descripción más o menos detallada siguiendo una línea temporal que engloba desde los orígenes de la disciplina hasta las estrategias más novedosas, entre las cuales se encuentra el método protagonista de los análisis comparativos que se llevarán a cabo en este proyecto.

2.2.1. Métodos primarios univariantes

En un principio, las investigaciones basadas en *GWAS*, ya sea integrando la influencia de los diferentes *QTLs* o no, se realizaron con la finalidad de comprobar la asociación de los *SNPs* analizados con diferentes variantes genéticas mediante el estudio de un único rasgo (única variable o *trait*). Este hecho determinaba la utilización de análisis estadísticos básicos univariantes, entre los cuales se encuentran:

- Sumario estadístico basado en *tablas de distribución de frecuencias*:
- Estadísticos de *centralización*:
- Estadísticos de *dispersión*:

Resulta evidente que con este tipo de análisis solo se puede realizar un análisis estadístico meramente descriptivo de la variable o *trait* considerado en cada caso, y pese a que resulta útil para determinar la calidad del gran volumen de datos de trabajo y

De este modo, este tipo de análisis, al centrarse en un solo *trait* de todos los disponibles en el gran volumen de datos de trabajo, no permiten tratar la posible relación causa-efecto subyacente a la expresión del rasgo considerado, obteniendo un mero análisis descriptivo de la variable dentro del conjunto de datos seleccionado.

2.2.2. Evolución de los métodos multivariantes y sus estrategias de aplicación

Alternativamente, gracias a la gran cantidad de datos disponibles últimamente con perfiles genómicos complejos (alta diversidad de rasgos moleculares), la necesidad de encontrar correlaciones entre las diferentes variables analizables y los rasgos de interés, ha resultado en un crecimiento en la utilización de métodos multivariantes para su análisis estadístico.

Seguidamente se detallarán las características principales de los más relevantes:

- Los métodos que modelan el genotipo como variable dependiente comprobando a su vez la asociación con una suma ponderada de fenotipos (*MV-PLINK* ([1]) o análisis de correlación canónica, y *MultiPhen* [2] que utiliza la regresión ordinal) adolecen de la posibilidad de evaluar diseños complejos que presentan mutiples interacciones entre el genotipo y otras covariables.
- Tanto el análisis multivariante de la varianza (*MANOVA*), como el de los modelos multivariantes lineales mixtos (*mvLMMs*) [3], resultan ser más tolerantes a estos diseños complejos al tratar los fenotipos como variables dependientes, introduciendo de forma natural el posible parentesco genético entre los individuos analizados. Esta ventaja se torna inconveniente para grandes conjuntos de datos, sobre todo para el método *mvLMMs*, cuya continua mejora en su implementación computacional sigue requiriendo de tiempos excesivamente altos.
- La pluralidad de los métodos de regresión multivariante presuponen una normalidad en la distribución de los errores del modelo que puede no llegar a cumplirse. Todo y que pueden aplicarse transformaciones individuales a cada rasgo estudiado, no puede garantizarse la normalidad multivariante, lo que resulta en una reducción de la potencia estadística en comparación con el modelo aplicado a los rasgos no transformados.
- Hasta el momento, las diversas implementaciones de *métodos bayesianos* para el estudio de asociaciones multirasgo no han sido satisfactorias, requiriendo siempre un tiempo elevado de cálculo debido al coste computacional que implican.
- Para los métodos *MTAR* [4] o *MOSTest* [5] [6] existe la necesidad de garantizar la normalidad multivariante asintótica cuando se utilizan los sumarios estadísticos univariantes, lo que no es trivial, sumado a que evitar la aparición de sesgos en la estimación de correlaciones de rasgos a partir de esta clase de estadísticos no es sencillo (afectaciones de heredabilidad de los rasgos, patrones de desequilibrio de ligamiento, etc.).

Con todo lo anterior, resulta evidente la necesidad de disponer de un método no paramétrico adecuado tanto para los estudios basados en *GWAS*.

2.2.3. MANTA - Implementación de la versión asintótica y no paramétrica de *PERMANOVA*

El modelo *PERMANOVA* ([7]) amplía el modelo lineal factorial univariante a múltiples dimensiones sin requerir una distribución de probabilidad conocida de las variables dependientes, introduciendo un enfoque basado en la distancia, poniendo a prueba la hipótesis de ausencia de efectos mediante un procedimiento de permutación basado en un estadístico *pseudo-F*, en el que las sumas de cuadrados del *ANOVA* se sustituyen por sumas de interdistancias entre observaciones.

Pese a ser exitoso en muchos estudios, dando buenos resultados en un tiempo de cálculo reducido para diseños fijos unidireccionales, resulta inviable en los estudios actuales, donde el mayor tamaño y complejidad de los conjuntos de datos requiere una precisión para el cálculo del valor p que este procedimiento permutacional no puede alcanzar en las condiciones requeridas.

Gracias al programa *MANTA* ([11], desarrollado principalmente en R), se estudia mediante diversas simulaciones ([12]) de diseños complejos la distribución asintótica de la estadística de pruebas *PERMANOVA* en el caso de la distancia euclídea (*valores p* de carácter no paramétrico y asintótico para modelos lineales multivariados), obteniendo resultados igualmente válidos tras cualquier transformación de los datos que preserve la independencia de las observaciones [8, 9, 10]

Capítulo 3

Resultados

A

Capítulo 4

Discusión

A

Capítulo 5

Conclusiones y trabajos futuros

5.1. Conclusiones

A

5.2. Líneas de futuro

A

5.3. Seguimiento de la planificación

A

Glosario

estadística multivariante La estadística multivariante o multivariada es una rama de las estadísticas que abarca la observación y el análisis simultáneos de más de una variable respuesta. La aplicación de la estadística multivariante es llamada análisis estadístico multivariante. [5](#)

GWAS En genética, un estudio de asociación del genoma completo (Genome-wide association study) o WGAS (Whole genome association study) es un análisis de una variación genética a lo largo de todo el genoma humano con el objetivo de identificar su asociación a un rasgo observable. Los GWAS suelen centrarse en asociaciones entre los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) y rasgos como las principales enfermedades. [5](#)

MANOVA En estadística el análisis multivariante de la varianza (Multivariate analysis of variance) es una extensión del análisis de la varianza o ANOVA para cubrir los casos donde hay más de una variable dependiente que no pueden ser combinadas de manera simple. Además de identificar si los cambios en las variables independientes tienen efectos significativos en las variables dependientes, la técnica también intenta identificar las interacciones entre las variables independientes y su grado de asociación con las dependientes. [6](#), [16](#)

MANTA Multivariate Asymptotic Non-parametric Test of Association. Este paquete, programado en lenguaje R, permite el cálculo no paramétrico y asintótico del p-valor para modelos lineales multivariados. [7](#), [17](#)

MOSTest Es una herramienta para unir el análisis genético de múltiples rasgos, que utiliza el análisis multivariado para aumentar la potencia, y así poder descubrir los loci asociados. [6](#), [16](#)

MTAR Marco desarrollado para el análisis multi-trait de RVAS. Se basa en un meta-modelo analítico de efectos aleatorios que utiliza diferentes estructuras de correlación de los efectos genéticos para representar un amplio espectro de patrones de asociación a través de rasgos y variantes. [6](#), [16](#)

MultiPhen Paquete de R que permite testear la asociación de múltiples rasgos. Realiza pruebas de asociación genética entre SNPs y múltiples fenotipos (por separado o en conjunto). [6](#), [16](#)

mvLMMs Los modelos lineales mixtos multivariados son poderosas herramientas para probar asociaciones entre polimorfismos de núcleo único y múltiples fenotipos correlacionados mientras controlan la estratificación de la población en estudios de asociación de todo el genoma. [6](#), [16](#)

PERMANOVA El análisis multivariante de la varianza con permutaciones (Permutational multivariate analysis of variance, PERMANOVA) es una prueba de permutación estadística multivariada no paramétrica. Se utiliza para comparar grupos de objetos y probar la hipótesis nula de que los centroides y la dispersión de los grupos definidos por el espacio de medida son equivalentes para todos los grupos. Un rechazo de la hipótesis nula significa que el centro y/o la dispersión de los objetos es diferente entre los grupos. De esta manera, la prueba se basa en el cálculo previo de la distancia entre cualesquier dos objetos incluidos en el experimento. [5](#)

pleiotropía En biología, la pleiotropía o polifenia es el fenómeno por el cual un solo gen o alelo es responsable de efectos fenotípicos o caracteres distintos y no relacionados (e.g. la fenilcetonuria, la talasemia o anemia de células falciformes, o el albinismo de los animales que tiene un efecto pleiotrópico en sus emociones haciéndolos más reactivos a su entorno). [5](#)

pseudo-F En el análisis multivariante de la varianza con permutaciones (*PERMANOVA*), el estadístico de prueba es una pseudo-ratio F, similar a la relación F en ANOVA. Compara la suma total de diferencias cuadradas (o diferencias de orden) entre objetos pertenecientes a diferentes grupos con la de objetos que pertenecen al mismo grupo. Las F-ratios más grandes indican una separación de grupo más pronunciada, sin embargo, la significación estadística de esta relación suele ser más interesante que su magnitud. [6](#), [17](#)

- RNA-seq** La secuenciación de ARN, también llamada *Secuenciación del Transcriptoma Entero para Clonación al Azar*, utiliza la secuenciación masiva (NGS) para revelar la presencia y cantidad de ARN, en una muestra biológica en un momento dado. De esta manera, la RNA-seq se usa para analizar cambios en el transcriptoma, concretamente, facilita la observación de transcritos resultantes del empalme alternativo, modificación postranscripcional, fusiones génicas, mutaciones/polimorfismos de nucleótidos únicos y cambios de expresión de genes. Puede ayudar a caracterizar poblaciones diferentes de RNA como miRNA, tRNA, y rRNA, o para determinar las fronteras exón/intrón y verificar o enmendar regiones 5' y 3'. [5](#)
- SNPs** Un polimorfismo puntual, también denominado de un solo nucleótido o SNP (Single Nucleotide Polymorphism, pronunciado snip), es una variación en la secuencia de ADN que afecta a una sola base (adenina (A), timina (T), citosina (C) o guanina (G)) de una secuencia del genoma. Sin embargo, generalmente se considera que cambios de unos pocos nucleótidos, como también pequeñas inserciones y deleciones (indels) pueden ser consideradas como SNP. Una de estas variaciones debe darse al menos en un 1% de la población para ser considerada como un SNP. Si no se llega al 1% no se considera SNP y sí una mutación puntual. En ocasiones estas variaciones de nucleótido único se asocian a otro término conocido como SNV (Single Nucleotide Variant), que a diferencia de los SNPs carece de limitaciones de frecuencia. [5](#)
- sQTLs** Los *Splicing quantitative trait loci* (sQTLs o splicing QTLs) son los loci que regulan el splicing alternativo del ARNm. Se pueden detectar utilizando datos de RNA-seq. Se han desarrollado diversos métodos para descubrir sQTLs, entre los que se incluyen: LeafCutter, Altrans, Cufflinks, y MISO. [5](#)
- trait** En el ámbito de la genética, un *trait* o *rasgo* es una característica específica de un individuo, los cuales pueden ser determinados por genes, factores ambientales o por una combinación de ambos. Se clasifican como cualitativos (e.g. el color de los ojos) o cuantitativos (e.g. la altura o la presión sanguínea). Cada uno de ellos forma parte del fenotipo general de un individuo. [5](#)
- valores p** En estadística general y contrastes de hipótesis, los valores p (p, p-valor, valor de p consignado, o p-value) se define como la probabilidad de que un valor estadístico calculado sea posible dada una hipótesis nula cierta. Ayuda a diferenciar resultados que son producto del azar del muestreo, de resultados que son estadísticamente significativos. Alternativamente, se define como la probabilidad de observar los resultados del estudio, u otros más alejados de la hipótesis nula, si la hipótesis nula fuera cierta, de manera que si este cumple con la condición de ser menor que un nivel de significancia impuesto arbitrariamente, este se considera como un resultado estadísticamente significativo y, por lo tanto, permite rechazar la hipótesis nula. [7](#), [17](#)

Referencias

- [1] M. A. R. Ferreira and S. M. Purcell, “A multivariate test of association,” *Bioinformatics (Oxford, England)*, vol. 25, no. 1, pp. 132–133, Jan. 2009.
- [2] L. Coin, P. O’Reilly, Y. Pompyen, and C. H. a. F. Calboli, “MultiPhen: A Package to Test for Multi-Trait Association,” Feb. 2020. [Online]. Available: <https://cran.r-project.org/web/packages/MultiPhen/index.html>
- [3] X. Zhou and M. Stephens, “Efficient multivariate linear mixed model algorithms for genome-wide association studies,” *Nature Methods*, vol. 11, no. 4, pp. 407–409, Apr. 2014, number: 4 Publisher: Nature Publishing Group. [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/nmeth.2848>
- [4] L. Luo, J. Shen, H. Zhang, A. Chhibber, D. V. Mehrotra, and Z.-Z. Tang, “Multi-trait analysis of rare-variant association summary statistics using MTAR,” *Nature Communications*, vol. 11, no. 1, p. 2850, Jun. 2020, number: 1 Publisher: Nature Publishing Group. [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/s41467-020-16591-0>
- [5] “precimed/mostest,” Jan. 2023, original-date: 2019-06-27T12:33:49Z. [Online]. Available: <https://github.com/precimed/mostest>
- [6] D. van der Meer, O. Frei, T. Kaufmann, A. A. Shadrin, A. Devor, O. B. Smeland, W. K. Thompson, C. C. Fan, D. Holland, L. T. Westlye, O. A. Andreassen, and A. M. Dale, “Understanding the genetic determinants of the brain with MOSTest,” *Nature Communications*, vol. 11, no. 1, p. 3512, Jul. 2020, number: 1 Publisher: Nature Publishing Group. [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/s41467-020-17368-1>
- [7] M. J. Anderson, “A new method for non-parametric multivariate analysis of variance,” *Austral Ecology*, vol. 26, no. 1, pp. 32–46, 2001, _eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x>. [Online]. Available: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x>
- [8] D. Garrido-Martín, M. Calvo, F. Reverter, and R. Guigó, “A fast non-parametric test of association for multiple traits,” *Bioinformatics*, preprint, Jun. 2022. [Online]. Available: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2022.06.06.493041>
- [9] D. Garrido-Martín, B. Borsari, M. Calvo, F. Reverter, and R. Guigó, “Identification and analysis of splicing quantitative trait loci across multiple tissues in the human genome,” *Nature Communications*, vol. 12, no. 1, p. 727, Feb. 2021, number: 1 Publisher: Nature Publishing Group. [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/s41467-020-20578-2>
- [10] J. Monlong, M. Calvo, P. G. Ferreira, and R. Guigó, “Identification of genetic variants associated with alternative splicing using sQTLseeker,” *Nature Communications*, vol. 5, no. 1, p. 4698, Aug. 2014, number: 1 Publisher: Nature Publishing Group. [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/ncomms5698>
- [11] D. Garrido-Martín, “MANTA,” Feb. 2023, original-date: 2019-02-27T12:09:53Z. [Online]. Available: <https://github.com/dgarrimar/manta>
- [12] ———, “manta-sim (sim),” Dec. 2022, original-date: 2022-02-16T12:40:23Z. [Online]. Available: <https://github.com/dgarrimar/manta-sim>
- [13] R. B. DAVIES, “Numerical inversion of a characteristic function,” *Biometrika*, vol. 60, no. 2, pp. 415–417, Aug. 1973. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1093/biomet/60.2.415>
- [14] R. B. Davies, “Algorithm AS 155: The Distribution of a Linear Combination of Chi2 Random Variables,” *Journal of the Royal Statistical Society. Series C (Applied Statistics)*, vol. 29, no. 3, pp. 323–333, 1980, publisher: [Wiley, Royal Statistical Society]. [Online]. Available: <https://www.jstor.org/stable/2346911>
- [15] T. Qi, Y. Wu, H. Fang, F. Zhang, S. Liu, J. Zeng, and J. Yang, “Genetic control of RNA splicing and its distinct role in complex trait variation,” *Nature Genetics*, vol. 54, no. 9, pp. 1355–1363, Sep. 2022, number: 9 Publisher: Nature Publishing Group. [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/s41588-022-01154-4>

- [16] S. Behjati and P. S. Tarpey, “What is next generation sequencing?” *Archives of Disease in Childhood. Education and Practice Edition*, vol. 98, no. 6, pp. 236–238, Dec. 2013. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3841808/>
- [17] “Next-Generation Sequencing (NGS) | Explore the technology.” [Online]. Available: <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing.html#>
- [18] Z. Wang, M. Gerstein, and M. Snyder, “RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics,” *Nature reviews. Genetics*, vol. 10, no. 1, pp. 57–63, Jan. 2009. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2949280/>
- [19] “RNA-Seq,” Feb. 2023, page Version ID: 149381500. [Online]. Available: <https://es.wikipedia.org/w/index.php?title=RNA-Seq&oldid=149381500>
- [20] V. Tam, N. Patel, M. Turcotte, Y. Bossé, G. Paré, and D. Meyre, “Benefits and limitations of genome-wide association studies,” *Nature Reviews Genetics*, vol. 20, no. 8, pp. 467–484, Aug. 2019, number: 8 Publisher: Nature Publishing Group. [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/s41576-019-0127-1>
- [21] D. Garrido Martín, “A Multivariate approach to study the genetic determinants of phenotypic traits,” Ph.D. Thesis, Universitat Pompeu Fabra, Jan. 2020, accepted: 2020-02-05T17:05:52Z Publication Title: TDX (Tesis Doctorals en Xarxa). [Online]. Available: <https://www.tdx.cat/handle/10803/668497>
- [22] S. Turner, L. L. Armstrong, Y. Bradford, C. S. Carlson, D. C. Crawford, A. T. Crenshaw, M. de Andrade, K. F. Doheny, J. L. Haines, G. Hayes, G. Jarvik, L. Jiang, I. J. Kullo, R. Li, H. Ling, T. A. Manolio, M. Matsumoto, C. A. McCarty, A. N. McDavid, D. B. Mirel, J. E. Paschall, E. W. Pugh, L. V. Rasmussen, R. A. Wilke, R. L. Zuvich, and M. D. Ritchie, “Quality Control Procedures for Genome Wide Association Studies,” *Current protocols in human genetics / editorial board, Jonathan L. Haines ... [et al.]*, vol. CHAPTER, p. Unit1.19, Jan. 2011. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3066182/>
- [23] “Genome-wide association study,” Apr. 2023, page Version ID: 1151122410. [Online]. Available: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Genome-wide_association_study&oldid=1151122410
- [24] “Splicing quantitative trait loci,” Mar. 2021, page Version ID: 1015148167. [Online]. Available: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Splicing_quantitative_trait_loci&oldid=1015148167
- [25] “Quantitative trait locus,” Apr. 2023, page Version ID: 1149148131. [Online]. Available: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Quantitative_trait_locus&oldid=1149148131
- [26] A. Takata, N. Matsumoto, and T. Kato, “Genome-wide identification of splicing QTLs in the human brain and their enrichment among schizophrenia-associated loci,” *Nature Communications*, vol. 8, p. 14519, Feb. 2017. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5333373/>
- [27] X. Zhang, R. Joehanes, B. H. Chen, T. Huan, S. Ying, P. J. Munson, A. D. Johnson, D. Levy, and C. J. O’Donnell, “Identification of common genetic variants controlling transcript isoform variation in human whole blood,” *Nature Genetics*, vol. 47, no. 4, pp. 345–352, Apr. 2015.