



Identificación de variantes en regiones codificantes de genes en pacientes colombianos utilizando técnicas de minería de datos

Jennifer Vélez Segura

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ingeniería, Departamento de Ing. Sistemas e Industrial
Bogotá D.C., Colombia
2017

Identificación de variantes en regiones codificantes de genes en pacientes colombianos utilizando técnicas de minería de datos

Jennifer Vélez Segura

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Bioinformática

Director(a):
Ph.D. Elizabeth León Guzmán

Línea de Investigación:
Minería de datos en Bioinformática
Grupo de Investigación:
MIDAS

Universidad Nacional de Colombia
Facultad Ingeniería, Departamento de Ing. Sistemas e Industrial
Bogotá D.C., Colombia
2017

(Dedicatoria o un lema)

Su uso es opcional y cada autor podrá determinar la distribución del texto en la página, se sugiere esta presentación. En ella el autor dedica su trabajo en forma especial a personas y/o entidades.

Por ejemplo:

A mis padres

o

La preocupación por el hombre y su destino siempre debe ser el interés primordial de todo esfuerzo técnico. Nunca olvides esto entre tus diagramas y ecuaciones.

Albert Einstein

Agradecimientos

Esta sección es opcional, en ella el autor agradece a las personas o instituciones que colaboraron en la realización de la tesis o trabajo de investigación. Si se incluye esta sección, deben aparecer los nombres completos, los cargos y su aporte al documento.

Resumen

El resumen es una presentación abreviada y precisa (la NTC 1486 de 2008 recomienda revisar la norma ISO 214 de 1976). Se debe usar una extensión máxima de 12 renglones. Se recomienda que este resumen sea analítico, es decir, que sea completo, con información cuantitativa y cualitativa, generalmente incluyendo los siguientes aspectos: objetivos, diseño, lugar y circunstancias, pacientes (u objetivo del estudio), intervención, mediciones y principales resultados, y conclusiones. Al final del resumen se deben usar palabras claves tomadas del texto (mínimo 3 y máximo 7 palabras), las cuales permiten la recuperación de la información.

Palabras clave: (máximo 10 palabras, preferiblemente seleccionadas de las listas internacionales que permitan el indizado cruzado).

A continuación se presentan algunos ejemplos de tesauros que se pueden consultar para asignar las palabras clave, según el área temática:

Artes: AAT: Art y Architecture Thesaurus.

Ciencias agropecuarias: 1) Agrovoc: Multilingual Agricultural Thesaurus - F.A.O. y 2) GEMET: General Multilingual Environmental Thesaurus.

Ciencias sociales y humanas: 1) Tesauro de la UNESCO y 2) Population Multilingual Thesaurus.

Ciencia y tecnología: 1) Astronomy Thesaurus Index. 2) Life Sciences Thesaurus, 3) Subject Vocabulary, Chemical Abstracts Service y 4) InterWATER: Tesauro de IRC - Centro Internacional de Agua Potable y Saneamiento.

Tecnologías y ciencias médicas: 1) MeSH: Medical Subject Headings (National Library of Medicine's USA) y 2) DECS: Descriptores en ciencias de la Salud (Biblioteca Regional de Medicina BIREME-OPS).

Multidisciplinarias: 1) LEMB - Listas de Encabezamientos de Materia y 2) LCSH- Library of Congress Subject Headings.

También se pueden encontrar listas de temas y palabras claves, consultando las distintas bases de datos disponibles a través del Portal del Sistema Nacional de Bibliotecas¹, en la sección Recursos bibliográficos. opción "Bases de datos".

Abstract

Es el mismo resumen pero traducido al inglés. Se debe usar una extensión máxima de 12 renglones. Al final del Abstract se deben traducir las anteriores palabras claves tomadas del

¹ver: www.sinab.unal.edu.co

texto (mínimo 3 y máximo 7 palabras), llamadas keywords. Es posible incluir el resumen en otro idioma diferente al español o al inglés, si se considera como importante dentro del tema tratado en la investigación, por ejemplo: un trabajo dedicado a problemas lingüísticos del mandarín seguramente estaría mejor con un resumen en mandarín.

Keywords: palabras clave en inglés(máximo 10 palabras, preferiblemente seleccionadas de las listas internacionales que permitan el indizado cruzado)

Contenido

Agradecimientos	VII
Resumen	IX
Lista de figuras	3
Lista de tablas	5
1 Introducción	6
2 Estado del Arte	10
2.1 Biología molecular y secuenciación masiva.	10
2.1.1 La secuenciación de siguiente generación (NGS) aplicaciones en salud	13
2.2 Bioinformática	13
2.2.1 Integración de datos genómicos y clínicos	13
2.2.2 Análisis de datos genómicos con aplicaciones clínicas	17
2.2.3 Minería de datos genómicos	19
3 Implementación de un pipeline para la identificación de variantes	20
3.1 Descubrimiento de variantes	20
3.2 Datos	21
3.3 Estrategias del pipeline	21
3.4 Resultados	23
3.5 Discusión	31
3.6 Conclusiones	34
4 Sistema de información	36
4.1 Introducción	36
4.2 Metodología	37
4.3 Resultados	37
4.4 Discusión	40
4.4.1 Gestión de datos biológicos	40
4.5 Conclusión	40
5 Capítulo 3	41

6	Capítulo ...	42
7	Conclusiones y recomendaciones	43
7.1	Conclusiones	43
7.2	Recomendaciones	43
	Bibliografía	44

Lista de Figuras

2.1. SNPs en Humanos.	12
3.1. Pipeline basado en las buenas practicas para el llamado de variantes.	22
3.2. Calidad del llamado de bases en una secuencia Estadísticas básicas del reporte FASTQ	24
3.3. Variantes obtenidas por Omics pipe	25
3.4. Variaciones de la muestra	25
3.5. Distribución de variantes a lo largo de los cromosomas	26
3.6. Distribución de variantes a lo largo de los cromosomas	26
3.7. Diagrama de relación entre variantes comunes de Omics y de Illumina	27
3.8. Distribución de variantes a lo largo de los cromosomas para los exomas.	28
3.9. Variaciones de la muestras dentro del exoma	28
3.10. Distribución de variantes a lo largo de los cromosomas para los exomas	29
3.11. Diagrama de relación entre las variantes publicas y las obtenidas por el pipeline	29
3.12. Imagen de la variante presenten en el exoma público	31
4.1. Interfaz de ingreso para administrar la base de datos.	37
4.2. Interfaz de administración.	38
4.3. Ingreso de pacientes.	38
4.4. Consulta a variantes	38
4.5. Modelo entidad relación	39

Lista de Tablas

2-1. SOFTWARE PARA LA INTEGRACIÓN DE DATOS GENÓMICOS CON FINES DE INVESTIGACIÓN	15
2-2. SOFTWARE DE INTEGRACIÓN DE DATOS GENÓMICOS CON FINES DIAGNÓSTICOS	16
2-3. SOFTWARE DE INTEGRACIÓN DE VARIANTES CON ENFERMEDADES	17
3-1. Tabla de datos utilizados.	23
3-2. Tabla de Variantes obtenidas.	24
3-3. Tabla de Variantes obtenidas a partir de un exoma.	27
3-4. Tabla de validación 1.	30
3-5. Tabla de validación 2.	30

1 Introducción

El desarrollo de este trabajo responde a la necesidad actual del país en cuanto a la utilización de las nuevas tecnologías de secuenciación masiva aplicadas a la salud de los colombianos, cuyos aportes muestran la relevancia del uso de estas tecnologías en el país que al ser combinadas con métodos de análisis de datos a gran escala permitiendo mostrar un acercamiento de la estructura genética de la población colombiana asociada a la información clínica disponible de los participantes dentro del estudio.

Además de mostrar la importancia de que exista una relación estrecha entre ciencia y tecnología para mejorar el diagnóstico y pronóstico de enfermedades presentes en la población colombiana aprovechando todos los avances que se encuentran a disposición actualmente y que permiten generar nuevos aportes con un impacto real en la salud.

En los últimos años con el desarrollo de las tecnologías NGS (Secuenciación de siguiente generación o secuenciación masiva) y otras áreas de la informática se ha introducido una nueva área en las tecnologías de la información conocida como Big Data [1]. En el campo de la bioinformática en concreto es el exoma o secuenciación del genoma completo (WES o WGS), que generan una gran cantidad de información con diferentes aplicaciones en la biotecnología y en la salud de nivel mundial [2]. La enorme cantidad de datos obtenidos por estas nuevas tecnologías presentan un desafío para ser analizados dado que la estadística tradicional aplicada en genética es poco efectiva para analizar datos de secuenciación de exomas y genomas debido a la gran cantidad de variantes que se obtienen a partir de los experimentos de secuenciación [3, 1].

La aplicación de la secuenciación masiva es posible de aplicar gracias a la reducción de costos y por su capacidad para dar un posible diagnóstico a pacientes que se les sospecha de un síndrome genético de características ambiguas y que con otros estudios no es posible aclarar, o para ser aplicados en paneles genéticos a pacientes que se les sospecha un síndrome específico [4].

Los datos biológicos en la actualidad están en la escala de petabyte y exabyte, presentando el reto de integrar información y de realizar su posterior análisis, por lo tanto es necesario desarrollar sistemas de información para el manejo y consulta de los datos obtenidos donde los genotipos y los fenotipos, dado que los datos de secuenciación contienen grandes cantida-

des de información que usualmente se almacena en bases de datos relacionales, después de realizada la anotación de variantes [5] [6].

Estos datos son considerados como "big data" dado que cumplen con los criterios de grandes cantidades de información, velocidad de procesamiento y veracidad de los datos, un ejemplo de esto fue el proyecto de 1000 Genomas, el cual por medio de la secuenciación de genomas completos se generó un sistema de información pública que contiene aproximadamente tres billones de nucleótidos y en el cual la población colombiana no está correctamente representada dado que se tomó solo una muestra poblacional de la ciudad de Medellín. Además estudios como el perfil de BRCA1 y BRCA2 con la implementación de la secuenciación masiva no tampoco representa la población colombiana [5, 7, 8].

La importancia de la caracterización de la población colombiana está dada porque la frecuencia de las variantes tienen un alto impacto en la clasificación de la misma siendo las variantes con baja frecuencia poblacional como posibles variantes patogénicas según la ACGM (Asociación Americana de Genética Médica) [9].

Para el manejo de estos tipos de datos se han desarrollado diversas herramientas que incluyen el procesamiento computacional y gestión de estos tipos de datos, así como la creación de buenas prácticas en marco de la integración del análisis de una manera reproducible. Pero el manejo de esta información por parte de los profesionales de las ciencias biológicas es una gran limitante dado que no tienen fundamentos de programación ni conocen los procedimientos que se utilizan normalmente en las ciencias de la computación, por lo tanto prefieren utilizar herramientas más amigables para su uso, pero esto implica un lento procesamiento de los datos ya que los flujos de trabajo que se lleguen a desarrollar son mediante aplicaciones gráficas que consumen más recursos computacionales [10].

La gestión y análisis de esta información requiere el desarrollo de herramientas que respondan a las necesidades de obtener características relevantes de la información biológica, por ello la implantación de técnicas minería de datos permiten generar hipótesis específicas con respecto a la información genómica [11]. Un ejemplo de esto es la utilización de algoritmos de agrupamiento para encontrar grupos de genes que están fuertemente relacionados con estados de evolución de los diferentes estadios en cáncer [5].

La gran cantidad de datos biológicos que se encuentran disponibles en la actualidad, deben ser tenidos en cuenta para la investigación y uso en el diagnóstico clínico, sin embargo estos datos presentan los siguientes inconvenientes para su acceso y disponibilidad como son: el almacenamiento, el procesamiento, la conexión y el análisis integrado de los mismos [12]. Por esta razón, en los procesos de diagnóstico se hace necesario reconocer los patrones sintomáticos de pacientes de los pacientes y asociarlos con variantes genéticas, ya que no ha sido

posible realizarlo fácilmente por diversas causas como la pérdida de información relevante el acceso a la misma, por ejemplo los datos que reposan en las historias clínicas, que para su acceso se requiere solicitar un permiso [12].

La importancia de entender las formas genéticas que pueden causar diversos síndromes y patología, pueden permitir que se le dé prioridad diagnóstica y de tratamiento a los pacientes afectados, teniendo en cuenta que aún se continúa descubriendo nuevos genes asociados a enfermedades, teniendo en cuenta que existen retos computacionales como la integración de datos heterogéneos y de grandes cantidades que lleva a la necesidad de aplicar metodologías “big data” y minería de datos para análisis de datos genómicos [13, 14, 15]. La diversidad de los datos permite que la utilización de técnicas de minería de datos se pueda aprovechar para dar respuesta al problema de asociación entre variantes genéticas y el impacto clínico de esas variantes [12].

En el presente trabajo se desarrollaron las siguientes actividades:

1. La implementación y validación de un pipeline para la identificación de variantes.
2. El diseño e implementación de un sistema de información para realizar la gestión de datos para las variantes obtenidas junto con la información clínica.
3. Finalmente un modelo para la minería de datos aplicada en pacientes colombianos.

Objetivos

Objetivo General

Proponer un modelo de minería de datos para la identificación de variantes en regiones codificantes de genes que apoyen el diagnóstico clínico en pacientes colombianos usando técnicas de minería de datos.

Objetivos Específicos

1. Generar un modelo de datos que permita la integración de los datos biológicos de tipo experimental, teórico y clínicos en una muestra poblacional que realice consultas rápidas de los datos almacenados.
2. Diseñar un modelo de minería de datos permita identificar las variantes experimentales que puedan ser patogénicas, teniendo en cuenta parámetros de asociación entre genes e información clínica que posibiliten teorizar posibles predicciones de las variantes.

3. Implementar un modelo de minería de datos que permita identificar posibles variantes patogénicas diferencialmente de las variantes no relevantes y su asociación a la información clínica disponible.
4. Validar el modelo de minería de datos implementado para la identificación de variantes patogénicas en pacientes colombianos utilizando regiones codificantes de genes asociados.

Contribuciones

- * Validación de un pipeline para la identificación de variantes en exomas humanos. Presentado en el Congreso de Genética Humana.2016
- * Diseño e implementación de la base de datos para integrar exomas ELAG.2017
- * Modelo de minería para análisis de variantes.
- * Estructura poblacional en una muestra de pacientes colombianos.
- * IV Congreso Colombiano de Bioinformática y Biología Computacional y la VIII Conferencia Iberoamericana de Bioinformática.2017.
- * Conferencia Pycon Colombia 2018.

Estructura del documento

El presente trabajo se distribuye en los capítulos de estado del arte, implementación del pipeline para el análisis de variantes, diseño e implementación de una base de datos, modelo de minería de datos, conclusiones y trabajo futuro.

2 Estado del Arte

Con el desarrollo de las tecnologías de secuenciación masiva los biólogos moleculares se han visto en la necesidad de utilizar metodologías computacionales para analizar datos biológicos a gran escala, además de la aplicación de estas tecnologías en medicina requieren de una estandarización y diseño que permita obtener nuevos conocimientos que sean aplicables en la salud de los colombianos.

2.1. Biología molecular y secuenciación masiva.

Desde que Watson y Crick propusieron la estructura del ADN en 1953 [16], el estudio del ADN ha sido básico en el desarrollo de la biología molecular, incluso el mismo Francis Crick fue quien propuso el dogma central de la misma para describir la relevancia del ADN en los seres vivos y la utilización de la información que contiene por las células, dada la importancia del ADN en las décadas de 1970 y 1980 se desarrollaron técnicas para determinar el orden de los nucleótidos (técnicas de secuenciación) de manera más eficiente que la secuenciación de las proteínas y se definieron secuencias de algunos organismos como el virus de Epstein Barr y de la mitocondria humana, mediante la utilización de métodos químicos propuestos por Maxam y Gilbert en 1977 y Sanger en 1980 siendo este último el más popular, estas técnicas son conocidas como técnicas primera generación [17].

Dada la importancia del ADN en las décadas de 1970 y 1980 se desarrollaron técnicas para determinar el orden de los nucleótidos (técnicas de secuenciación) de una manera más eficiente que la secuenciación de las proteínas y se definieron secuencias de algunos organismos como el virus de Epstein Barr y de la mitocondria humana, mediante la utilización de métodos químicos propuestos por Maxam y Gilbert en 1977 y Sanger en 1980 siendo este último el más popular, estas técnicas son conocidas como técnicas primera generación [17].

Los métodos desarrollados para secuenciar prosperaron y con el proyecto del genoma humano que comenzó en 1980 y fue completado en el 2003, permitió que se desarrollaran nuevas tecnologías para optimizar el proceso de secuenciación y disminuir sus costos, inicialmente fue el secuenciador de Illumina que en el 2008 permitió obtener el primer individuo humano secuenciado con esta tecnología [18]. Estas nuevas tecnologías se fueron desarrollando en otras plataformas, tales como el secuenciador de Roche 454 y el SOLiD de Applied Biosystems.

[18] y son conocidas como tecnologías de última generación o de siguiente generación (Next-generation sequencing, NGS), que tienen la capacidad de realizar secuenciaciones de alto rendimiento de una manera más rápida y económica que las de primera generación [17]. La diferencia entre las técnicas de secuenciación de primera generación y las de NGS se presenta en el hecho de que la nueva generación genera lecturas de menos de 500 pares de bases en comparación a las 1000 pares de bases de sanger [18, 19].

El desarrollo de estas tecnologías ha hecho que los datos genómicos aumenten de una manera vertiginosa, y permiten que se pueda realizar análisis en diferentes organismos con aplicaciones en biotecnología y salud [17]. Se ha estimado que cada genoma humano tiene alrededor de 3.5 millones de diferencias con respecto al genoma de referencia (Genoma de consenso para la salud humana), estas diferencias son llamadas variantes y pueden determinar el fenotipo de los individuos, algunas de estas variantes son conocidas para indicar predisposiciones a enfermedades [20].

En el campo de la salud actualmente se emplea la secuenciación de exomas es la más utilizada puesto que se considera que los exones son las regiones de ADN conservadas y expresadas, (se traducirán en ARNm y posteriormente en proteínas) y representan menos del 2 % el genoma humano pero se estima que contiene el 85 % de las variantes conocidas de enfermedades, lo que permite la reducción de costos y una buena alternativa frente a la secuenciación de genomas completos [21, 22, 17].

Dado que la utilización de NGS permitió dar respuesta para entender enfermedades raras, ya que fue posible identificar las regiones responsables de una enfermedad, teniendo como control los datos poblacionales como el proyecto de 1000 genomas, los datos genómicos pueden también pueden ser útiles para la caracterización de enfermedades poligénicas y su asociación con las variaciones genómicas presentes en el individuo [23].

La secuenciación de exones (secuenciación de exoma) ha sido un buen método para identificar SNPs (Polimorfismos de Nucleótido Único) y los SNV (Variantes de nucleótido simple) como se observa en la siguiente figura 2.1, y permitió identificar pequeñas delecciones o inserciones (indels) que pueden ser la causa de enfermedades y de la variación en los fenotipos [24, ?].

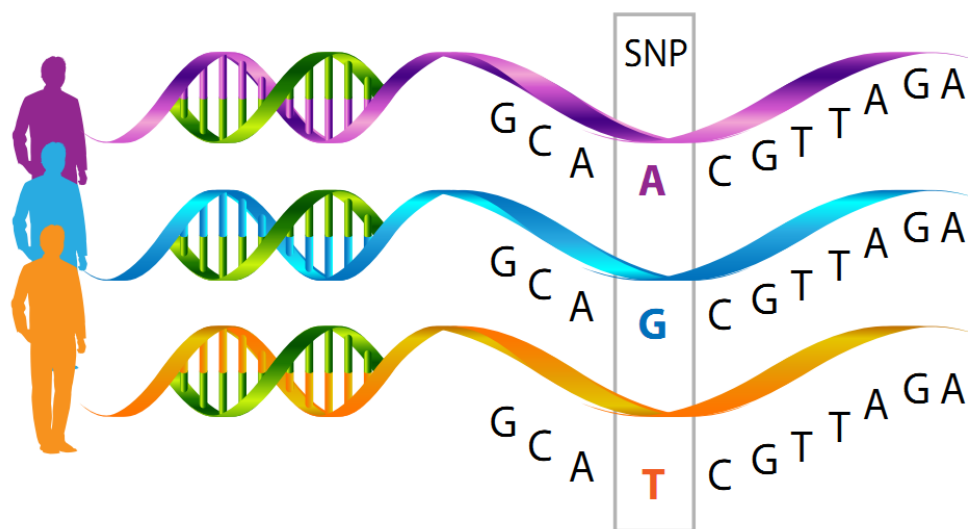


Figura 2.1: SNPs en Humanos.

A partir de la información pública disponible se ha estimado que las variantes pueden afectar la función de la proteína ya su vez pueden estar asociados a otros genes dentro de una enfermedad, aunque en genética humana la frecuencia de una variante específica dentro de la población es clasificada como benigna (No genera una enfermedad), por ello la importancia de la integración de la información y la revisión de la variante [25].

La identificación de variantes se realiza con diversas plataformas siendo el MiSeq es un sistema de secuenciación de Illumina que permite la secuenciación de 4800 genes en un solo experimento y una de las más populares [21]. En cuanto al análisis de los datos esta plataforma incluye un servicio de computación en la nube (BaseSpace), donde los datos biológicos son analizados sin necesidad de que los investigadores tengan habilidades en bioinformática. Pero están disponibles como herramientas solamente de investigación y no como diagnóstico [21].

A pesar de ser herramientas de investigación que han sido desarrolladas, Illumina permite que dentro del BaseSpace se publiquen nuevos algoritmos, herramientas abiertas o aplicaciones diseñadas por desarrolladores que permitan mejorar estos análisis genómicos y la aplicación en diversas en sus diversas plataformas de secuenciación que ofrece esta empresa [21].

Los datos obtenidos a partir de técnicas de NGS han tenido un crecimiento vertiginoso y presentan un reto para el manejo y análisis de los mismos, debido a que los formatos de los datos y las inconsistencias de las secuencias como resultado de los procesos experimentales, la importación de las secuencias a nivel digital, el ensamblaje de los fragmentos de ADN, el alineamiento y post-alineamiento de grandes cantidades de datos biológicos hace que se con-

vierta en una de las bases de la investigación en bioinformática [24, 26].

2.1.1. La secuenciación de siguiente generación (NGS) aplicaciones en salud

El cáncer de seno es una enfermedad que afecta principalmente a mujeres y que en estadios avanzados tienen una alta tasa de mortalidad por lo que ha recibido una importante atención de por la comunidad de investigadores, principalmente en el área biomédica con la intención de buscar marcadores genéticos de la enfermedad. Actualmente se encuentra una gran cantidad de investigaciones publicadas, donde se intenta visualizar las interacciones de los genes como esos marcadores en las distintas poblaciones [27].

Teniendo en cuenta que el cáncer el resultado de una mutación de ADN, donde la consecuencia es que la célula portadora de la mutación pierda su función normal y gane la habilidad de multiplicarse de manera indefinida sobre los tejidos normales. Donde la identificación más común para realizar la identificación de biomarcadores genéticos es la utilización de NGS, donde la variación de un gen puede alterar la función celular y se causal de la enfermedad y en algunos casos ser heredable y predisponente al desarrollo de la enfermedad [27, ?].

La fibrosis quística es una enfermedad multisistémica causada por mutaciones puntuales en el gen CFTR [28]

2.2. Bioinformática

La bioinformática trata sobre el almacenamiento, simulación y análisis de datos biológicos con el uso de herramientas computacionales como la minería de datos, siendo definida como una herramienta de investigación, desarrollo y aplicación de enfoques computacionales para expandir el uso de los datos biológicos y médicos, incluyendo las herramientas que permitan almacenar, archivar y análisis o visualizar dichos datos [29]

El auge de las tecnología de NGS permitió que la bioinformática diera respuesta a las dificultades que presenta la genómica en la búsqueda de ser una nueva innovación biomédica y en otras áreas de las ciencias biológicas, donde el valor de la bioinformática radica en la promesa de que la información genómica tiene grandes beneficios que son aplicables al área de la salud aunque estos la obtención de información relevante presentan un varios retos uno de ellos es la integración de los datos genómicos y clínicos y los derechos de propiedad sobre los mismos[30].

2.2.1. Integración de datos genómicos y clínicos

En la era de las omicas, los datos se presentan en diferentes formas y en varios niveles en términos biológicos, los cuales incluyen los datos genómicos, datos de transcriptómica,

epigenómica, metabolómica, entre otros, donde se incluyen también las diferentes datos poblacionales humanos y las historias clínicas, la escala de estos datos se encuentran entre pentabyte y exabyte [5]. Aunque la definición de “big data” es muy discutida dentro de las ciencias de la información, sin embargo el nombre se hace referencia a la “gran cantidad de datos” que se caracterizan por el volumen del procesamiento, la variabilidad de los mismos y la veracidad de la calidad de los datos [5]. Partiendo de lo anterior los datos genómicos pueden ser catalogados como “big data” ya que poseen las siguientes características: Son numerosos, no pueden ser almacenados dentro de una base regular de datos, la velocidad de generación y procesamiento es muy rápida [31].

En el diagnóstico de enfermedades los datos genómicos vistos como “big data” comparten los mismos retos tecnológicos como son: el almacenamiento, la transferencia de la información, control del acceso y manejo de la información, otros retos computacionales propios de los datos es el moldeamiento de los sistemas biológicos, la gran escala y diversidad de los datos donde los modelos no optimizados que pueden fallar [32].

Para el manejo de los datos se han aplicado varios modelos de sistemas de información en bioinformática con diversas herramientas para integrar datos biológicos, utilizando sistemas de bodega de datos que están disponibles de manera gratuita y que fueron desarrollados con el fin de dar respuesta algunos de los problemas en el manejo de datos biológicos, dada la importancia que tiene de poder utilizar toda la información necesaria de manera eficiente [26], algunas de estas bases de datos públicas son las de NCBI y ensambl que hacen parte de un consorcio internacional [33, 34]. En la tabla **2-1** se describen algunos softwares libres para la integración de datos.

Tabla 2-1: SOFTWARE PARA LA INTEGRACIÓN DE DATOS GENÓMICOS CON FINES DE INVESTIGACIÓN

Software	Descripción
BioMart	Permite la integración de datos biológicos, esta herramienta optimiza de manera rápida la integración de grandes cantidades de datos, de fácil uso (los biólogos moleculares y médicos no poseen generalmente bases sólidas de programación) y ha sido usado por laboratorios para integrar portales de enfermedades de cáncer, datos de microarreglos y expresión génica [26].
BioXRT	Fue desarrollado por biólogos para publicar sus datos en internet, está recomendado para laboratorios pequeños y que necesiten publicar sus resultados para correlacionarlos con otros resultados de otros laboratorios, también ha sido utilizado en varios proyectos para la anotación del cromosoma 7 y el estudio estructural de variantes genéticas asociadas a autismo [26].
InterMine	Provee un modelo de datos para llamar 28 bases de datos libres como Gene Ontology, que permite la implementación de flujos de trabajos de manera automatizada [26].
PathwayTools	Es una herramienta que permite utilizar organismos específicos para realizar las búsquedas o modelos de organismos en las bases de datos, estas pueden ser publicadas y visualizadas en la web, incluye una predicción de varias reacciones metabólicas de los microorganismos [26].
Illumina	Presenta su propia herramienta integradora que permite hacer la anotación funcional de genes, la filtración y categorización de datos que puedan tener un impacto biológico en variantes relevantes, generando un reporte resumido de las enfermedades con un significado biológico y en un formato estructurado, pero no integra la información clínica de un paciente [21].

Muchas herramientas han sido implementadas con fines de investigación, más no con fines diagnósticos, en este sentido se han implementado otras herramientas que permiten integrar datos con fines diagnósticos, ya que en este caso se requieren parámetros de seguridad por los datos que contienen información clínica y que deben ser manejados de manera privada. Esto implica otro manejo de datos biológicos ya que se adicionan nuevos datos como condiciones del paciente, tratamientos entre otros datos [35]. La tabla **2-3** presenta algunos de los

softwares para integrar datos con fines de diagnósticos.

Tabla 2-2: SOFTWARE DE INTEGRACIÓN DE DATOS GENÓMICOS CON FINES DIAGNÓSTICOS

Software	Descripción
BRISK: Biology-Related Information Storage kit	Es un paquete de recursos abiertos, permite relacionar una descripción fenotípica y una mutación somática (SNP), lo que permite a los investigadores proveer una asociación de estudios genómicos y capacidades de análisis, teniendo en cuenta el manejo de la muestra [26].
CaTRip	Fue desarrollada como un componente de caBIG, este software permite encontrar pacientes con perfiles similares, teniendo en cuenta el registro que hay dentro del sistema de datos clínicos, permite almacenar, cualificar y analizar datos de diferentes tipos de cáncer [35].
CBio Cancer Genomics Portal	Es otra herramienta que permite integrar datos definidos en la historia clínica de un paciente, como su descripción fenotípica, con la mayor cantidad de datos de ADN, ARNm, proteínas y de las imágenes obtenidas dentro de los diferentes exámenes realizados al paciente [35].
G-DOC Georgetown Database of Cancer	Fue desarrollada para integrar datos de las características de los pacientes con los datos biológicos, esta herramienta se enfoca en la visualización y análisis de datos [35].
iCOD Integrated Clinical Omics Database	Esta herramienta combina la patología clínica de los pacientes y la información molecular de pacientes con el fin de dar una información holística de los pacientes, fue desarrollado de manera local y permite la visualización de mapas de enfermedades que permite la interrelación clínica con los datos biológicos [35].
iDASH Integrating data for analysis, anonymization and sharing	No es una herramienta, pero si es un a infraestructura poderosa que permite la integración de datos y su análisis, distribuye herramientas y algoritmos enfocados en la privacidad de los datos [35].
tranSMART	Es una herramienta abierta que permite a los investigadores hacer relaciones entre el fenotipo y los datos moleculares, Da a los investigadores herramientas para generar descripciones y análisis estadísticos [35].

Otras herramientas han sido desarrolladas para encontrar asociaciones de variantes y genes afectados con las enfermedades requieren que se combinen los análisis de variantes con los individuos donde se tenga acceso a la información de manera eficiente [20]. Algunas implementaciones desarrolladas para hacer esta tarea son:

Tabla 2-3: SOFTWARE DE INTEGRACIÓN DE VARIANTES CON ENFERMEDADES

Software	Descripción
Variant-DataBase (Variant-DB) within	Es una base de datos implementada en PostgreSQL junto con Django para almacenar y manejar datos genómicos que se con tranSMART para asociar las variantes a un fenotipo [20].
HGVD	Es una herramienta con acceso web que permite manejar las variantes dentro de la población japonesa obtenidas a partir de secuenciación de exomas y genomas implementada en PostgreSQL y la interfaz grafica con JBrowse [36].
Variome Project	Es un proyecto no gubernamental internacional que trabaja para integrar las variaciones genéticas y su efecto en la salud humana y que a su vez esta información sea curada, interpretada y compartida de manera gratuita [37].

2.2.2. Análisis de datos genómicos con aplicaciones clínicas

A nivel mundial se han clasificado los datos genómicos en cinco tipos que son de gran tamaño y que son ampliamente usados en la investigación en bioinformática, estos datos son: 1) Los de expresión génica, 2) datos de secuenciación de ADN, ARN y proteínas, 3) los de interacciones entre proteínas (PPI), 4) los de ruta metabólicas y 5) los datos de gene ontology (GO). Además se encuentran los datos de redes donde se asocian los genes con enfermedades que tienen una alta importancia en la investigación y el diagnostico [38].

Dentro del análisis de datos de secuenciación los desarrollos se han enfocado en el manejo de la gran cantidad de información generada, mientras que en las asociaciones con enfermedad se enfocan en la asociación multi-objetivo entre la enfermedad y las redes heterogéneas son utilizados para establecer la relaciones entre los genes y la enfermedad; la complejidad de estas relaciones implican la utilización de herramientas de aprendizaje de máquina para reorganizar y visualizar la gran cantidad de datos obtenidos, y así poder realizar análisis y diagnóstico de enfermedades [38].

Dentro de las secuencias para el análisis a gran escala se ha utilizado la plataforma de Hadoop MapReduce, utilizando también BioPig como herramienta que se basa en el análisis de secuencias a nivel masivo utilizando la arquitectura de MapReduce, otra herramienta está el Crossbow que se combina con Bowtie para dar una respuesta ultrarrápida con un uso eficiente de memoria para el alineamiento de lecturas cortas y SoapSNP que permite la identificación de SNP en genomas completos a través de computación en la nube o de manera local utilizando un clúster de hadoop. Otras herramientas basadas en la nube son Stormbow, CloVR y Rainbow. Otras plataformas que no utilizan herramientas de big data son Vmatch y SeqMonk [38].

Una de las herramientas más populares para el manejo el análisis de secuenciación de alto son Galaxy Project que permite el análisis de los diferentes tipos de datos por medio de una interfaz web o de manera local y es un software libre, también permite crear flujos de trabajo automatizados [17]. Otra herramienta es GATK que fue desarrollada por el Broad Institute y que se enfoca en el descubrimiento de variantes a diferentes niveles y con diversos organismos y con usos investigativos [18]. GATK a diferencia de Galaxy Project no tiene una interfaz gráfica y debe ser instalado en equipos con Linux y basa su arquitectura utilizando hadoop MapReduce para el procesamiento de los datos [13] .

Igualmente se han realizado implementaciones para análisis en bioinformática implementado los algoritmos de alineamiento múltiple en Hadoop y utilizando HBase, paralelizando la versión del NCBI del algoritmo BLAST, también se ha aplicado a nivel clínico la cantidad de datos producidos por los laboratorios como los record médicos electrónicos, datos biomédicos, datos biométricos, expresión génica entro otros y se ha utilizado el framework de MapReduce para realizar análisis simultáneo con un retorno rápido de resultados, haciendo que la promesa de que los análisis de “big data” en bioinformática y la salud sea aplicable [1].

Cada una de las herramientas han sido desarrolladas para responder al manejo datos en bioinformática y su análisis, Colombia se ha propuesto el usos de las bodegas de datos para dar soporte a la investigación, ya que el uso de estas metodologías han sido ampliamente aplicados en inteligencia de negocios, y se presenta la modelación multidimensional de datos biomédicos basados en bodega de datos [39].

Bustos [39] y colaboradores proponen que la bodega de datos aplicable en bioinformática es un hibrido entre Data Warehouse (bodega de datos) y data marts, utilizando la aplicación de descubrimiento de conocimiento (KDD) en los datos almacenados. El modelo propuesto es: 1) La selección de datos. 2) El agrupamiento y 3) Clasificación. En bioinformática se han aplicado las técnicas de minería para tratar de resolver diversos problemas biológicos, dependiendo del tipo de problema que se quiera abordar. Por ejemplo para la exploración de variantes de nucleótido simple (SNPs) asociados a enfermedades se ha implementado el

algoritmo Apriori para buscar dentro de un set de atributos reglas que sean consistentes con la literatura, teniendo en cuenta que existen millones de SNPs que están correlacionados con varios fenotipos [40].

2.2.3. Minería de datos genómicos

Las inferencias con respecto a las grandes cantidades de datos genómicos requieren análisis computacionales para interpretar los datos, siendo una de las áreas más activas de análisis donde se utiliza la minería de datos (entendiendo la minería de datos como el método de extraer información por medio del aprendizaje de máquina, la estadística, la inteligencia artificial, patrones de reconocimiento y visualización,) para resolver problemas biológicos, algunos ejemplos donde se ha aplicado técnicas de minería es la clasificación de genes, análisis de mutaciones en cáncer y expresión de genes [29].

También han sido aplicadas técnicas de agrupación de genes expresados diferencialmente, las máquinas de soporte vectorial han sido utilizadas para asociar interacciones entre genes y generar redes biológicas, igualmente las metodologías tradicionales de minería de datos en ocasiones no son precisas o eficientes y requieren que se desarrollen nuevos algoritmos y metodologías que respondan de una manera más acertada a una pregunta biológica [41]. Sin olvidar que se requiere evaluar las plataformas disponibles, las herramientas tecnológicas que permitan la implementación de procesos que asocien los datos a la investigación y obtener resultados más generalizados. Esto debe estar aplicado a los requerimientos de los investigadores para garantizar una implementación exitosa [39, 41].

Algunas de las tareas de minería de datos son: 1. Clasificación: Donde se clasifican los datos a una clase predefinida, 2. Asociación: Ver elementos que están asociados mediante reglas, 3. El clustering o agrupamiento: Como la definición de una población de datos dentro de un subgrupo o cluster [29].

La utilización de las técnicas de secuenciación de alto rendimiento junto la aplicación de técnicas de minería de datos pueden aportar al diagnóstico de enfermedades complejas como las fallas cardíacas y el cáncer que presentan diversas causas [14]. Partiendo de lo anterior se hace necesario saber la relación entre las moléculas biológicas y las características de una enfermedad vistas desde la alteración de uno o varios genes y las posibles alteraciones que estos causan en una persona [5].

3 Implementación de un pipeline para la identificación de variantes

En este capítulo se presenta la validación de un pipeline para la identificación de variantes a partir de datos de secuenciación masiva, donde se utiliza datos públicos como los propios de la población muestreada para validar la calidad de las variantes que posteriormente fueron almacenadas en a base de datos.

3.1. Descubrimiento de variantes

La eficiencia del descubrimiento de variantes depende de la exactitud del llamado de las bases (la identificación correcta de cada nucleótido dentro de la secuencia), esto es realizado durante el proceso de secuenciación de alta velocidad con la que se identifican los nucleótidos hace que puedan ocurrir errores en la identificación correcta de las bases, se considera que al momento la exactitud de ese llamado esta alrededor del 99.5 % [42]. Teniendo en cuenta lo anterior es recomendable priorizar la sensibilidad (Buscar tantas variantes como sea posible para evitar perder cualquier variante) sobre la especificidad (Limita la proporción de falsos positivos en un conjunto de variantes) [43].

Para el presente trabajo se realizaron mediciones de la calidad de las secuencias y el mapeo, post-alineamiento y el llamado de variantes, siguiendo las buenas practicas para el llamado de variantes [10]. Teniendo en cuenta que existen múltiples herramientas para realizar el llamado de variantes tanto de uso privado como open source que permite seguir las buenas practicas de identificación de variantes se hace necesario integrar las diversas herramientas para poder obtener las datos de buena calidad. Y surge la pregunta de ¿cuáles de todos los métodos y las herramientas son la más apropiada para hacer el llamado de variantes en exones [44][45].

Para dar respuesta a esta pregunta se han seguido la propuesta de buenas practicas para el llamado de variantes propuesto por el Broad Institute que incluyen el procesamiento de los datos, el mapeo (Alinamiento de las secuencias), descubrimiento de variantes y la recalibración del set de variantes.

Para poder llevar acabo la adecuada implementación se hace necesario la utilización de HPC (Computación de alto desempeño) donde la utilización de un clúster para bioinformática

presentan una gran apoyo para el procesamiento y análisis de datos incluso es un requisito de algunos módulos para poder implementarse adecuadamente [10].

3.2. Datos

Los datos que fueron procesados en el presente trabajo son secuencias de 4813 exones humanos se obtuvieron de kit de Illumina TruSight One en muestras de sangre periférica. Estos datos fueron donados por el Centro de Investigaciones en Genética Humana y Reproductiva GENETIX S.A.S dirigido por la Dra Claudia Serrano Médico Genetista.

Para la validación del pipeline se corrió un exoma público de NA12878-NGv3-LAB1360 que pertenece a una mujer que tiene una variación en el gen CYP2C19 donde tiene una transición de una Guanina por una Adenina en la posición 681 del exón 5, que causa un cambio en el marco de lectura del ARNm a partir del aminoácido 215 y produce un códon de parada prematuro en 20 aminoácidos corriente abajo produciendo una proteína no funcional (*Información obtenida de Coriell Institute for medical research*). Se descargó el archivo bed para filtrar las variantes que se encuentran dentro del genoma completo de la muestra para obtener solo exones del NCBI para el genoma hg19. También se realizó una obtención de variantes a partir de un exoma completo público de la muestra NA12878, los datos fueron obtenidos vía ftp en la siguiente dirección:

https://s3.amazonaws.com/bcbio_nextgen/NA12878-NGv3-LAB1360-A_1.fastq.gz

https://s3.amazonaws.com/bcbio_nextgen/NA12878-NGv3-LAB1360-A_2.fastq.gz

Y el archivo bed para filtrar las variantes que se encuentran dentro del genoma completo de la muestra se obtuvo de la siguiente página para el genoma hg19:

<ftp://ftp-trace.ncbi.nlm.nih.gov/giab/ftp/data/NA12878/analysis/>

`Illumina.PlatinumGenomes_NA12877_NA12878_09162015/hg19/8.0.1/NA12878/`

3.3. Estrategias del pipeline

Existen una serie de pasos para la obtención de variantes la obtención de la calidad de las secuencias y preprocesamiento como la remoción de adaptadores y de nucleótidos con baja calidad (que son erróneamente identificados por el secuenciador), posteriormente sigue el mapeo, post-alineamiento, llamado de variantes, anotación y priorización [44].

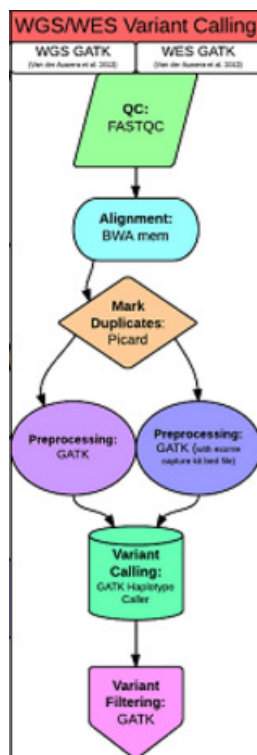


Figura 3.1: Pipeline basado en las buenas practicas para el llamado de variantes.

Se utilizo como base modulo de omics-pipe propuesto por Fish y colaboradores [10] que presenta el pipeline que es acorde con las buenas practicas para el llamado de variantes en la figura 3.1

Herramientas computacionales

Las herramientas bioinformáticas seleccionadas se implementaron en un clúster ¹ que cuenta con las siguientes características:

- ⇒ Un nodo mastes con 2 procesadores Intel Xeon E5-2695 – 24 cores 48 con HT / 192 GB RAM (230Gflops), 300 GB de Disco duro.
- ⇒ Se tienen 19 nodos de trabajo con 2 procecesadores Intel Xeon E5-2695 – 24 cores 48 con HT / 192 GB RAM (4.378Tflops), 300 GB de de Disco duro.
- ⇒ Se cuentan con otros 7 nodos de trabajo con 4 procesadores AMD Opteron 6282 SE – 64 cores / 128 GB RAM (3.659Tflops), 200 GB de Disco duro.
- ⇒ 1 GPU tesla K20 como nodo de trabajo con 2 Procesores Intel Xeon X5690 - 12 cores / 192 GB RAM (3.659Tflops), 1.6 TB de Disco duro.

¹El clúster utilizado fue prestado por la Universidad de los Andes

Y se instaló el módulo para python de omics-pipe, para python 2 con la herramienta de R y las librerías que solicita omics-pipe[10], el algoritmo BWA, samtools, vcftools, GATK 3.5, picard, FASTQC y pbs-drmmma. Una vez instalados los programas se procesaron las muestras dentro del clúster.

Diseños experimentales

La tabla 3-1 muestra los diseños experimentales realizados para validar las variantes:

	Experimentos	
	NA12878(Exoma público)	Variantes Illumina (Paciente)
Variantes Omics	Datos de pacientes	Datos exoma
Variantes Calibradas	Datos de paciente	Datos exoma
Variantes Illumina	Datos de paciente	Datos exoma

Tabla 3-1: Tabla de datos utilizados.

3.4. Resultados

Reporte FASTQC

Este reporte utilizando la herramienta FASTQC presenta inicialmente un resumen del estado de las secuencias obtenidas, ya que toma el archivo fastq y lee las métricas de calidad de cada una de las bases y genera un reporte general en formato HTML. Ya que es interactivo y genera varios módulos [46].

Este reporte no presenta fallas dentro del análisis. A continuación se muestra un primer módulo del reporte FASTQ obtenido de un dato experimental de una secuenciación de 4813 genes que resume el estado general de las lecturas obtenidas para este caso, la figura 3.2 muestra que la calidad de las secuencias es mayor a 30, el reporte general también muestra que no hay secuencias adaptadoras, que presenta una distribución media del largo de las secuencias aceptable y que no hay secuencias sobre representadas.

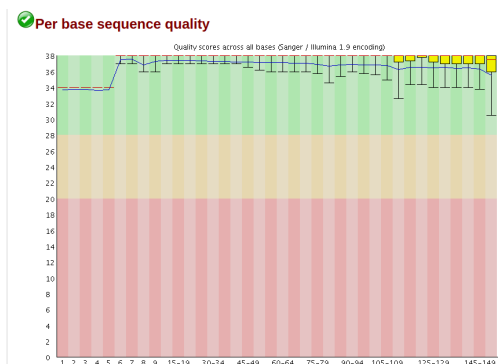


Figura 3.2: Calidad del llamado de bases en una secuencia Estadísticas básicas del reporte FASTQ

Para el caso de esta muestra la calidad es óptima en todos los datos obtenidos y no requieren de ningún tipo de trimming ya que la mayoría de las posiciones dentro de la secuencia se encuentran por encima de un valor por encima de 34 y el cual el valor mínimo es 20 (este valor representa el (Q_{PHARED}) que implementa el secuenciador [46].

Variantes de illumina vs variantes de omics

Inicialmente se obtuvieron 63515 variantes una vez que se ejecuto el pipeline de omics para la obtención de variantes, siguiendo los protocolos de buenas practicas y los protocolos de GATK quienes recomiendan generar variantes altamente sensibles y poco precisas, esto con el fin de no perder variantes que se encuentren dentro de las secuencias obtenidas, por ello se muestra una gran cantidad de variantes que no corresponden con las variantes verdaderas [43]. Dentro del pipeline solo se encuentra el proceso de llamado de variantes y no el proceso de filtrado de las mismas y que debió ser implementado de manera manual.

A partir de la aplicación del pipeline se obtuvieron los siguientes resultados representado en tabla (3-2):

	Variantes			
	SNP	Indels	Desconocida	Total
Variantes Omics	54538	8855	122	63515
Variantes Calibradas	10425	828	44	11297
Variantes Illumina	9601	436	28	10065

Tabla 3-2: Tabla de Variantes obtenidas.

De las variantes sin hard filtering se obtuvieron 54538 SNP, Indels 8855 y 122 variantes desconocidas, que se representan el siguiente gráfico 3.3:

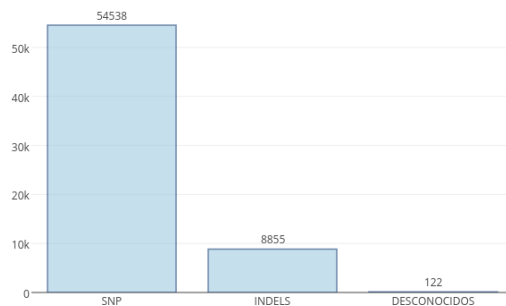
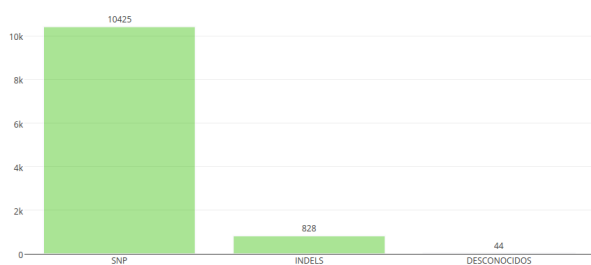
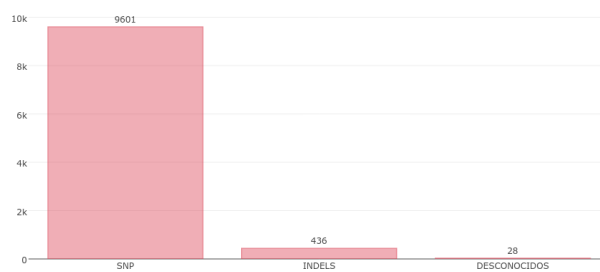


Figura 3.3: Variantes obtenidas por Omics pipe

Una vez realizado el hard filtering se obtuvo los siguientes resultados: 10425 SNP, 828 Indels y 44 desconocidos, también se tiene las variantes reportadas para el mismo individuo desde la plataforma de illumina con los siguientes resultados: 9601 variantes, 436 indels y 28 desconocidas y respresentado por la figura 3.4:



(a) Variantes obtenidas por Omics pipe



(b) Variantes calibradas

Figura 3.4: Variaciones de la muestra

Se realizo un distribución de las variantes según cada técnica sin filtrado (para el caso de omics) para el siguiente gráfico mostrados en las siguientes figuras 3.5 y 3.6 :

Cromosoma	Variantes Omics	Variantes Calibradas	Variantes Illumina
1	5600	1000	964
2	4675	782	701
3	3546	676	540
4	2959	481	414
5	2702	502	438
6	3384	556	795
7	3313	502	447
8	2306	415	372
9	2799	491	401
10	2998	524	381
11	3289	776	610
12	3192	607	535
13	1433	223	191
14	1530	275	258
15	2233	400	327
16	2529	478	472
17	3172	681	611
18	1434	184	184
19	2651	704	544
20	1245	244	195
21	1135	178	136
22	1315	271	262
X	1615	299	249
Y	437	4	10

Figura 3.5: Distribución de variantes a lo largo de los cromosomas

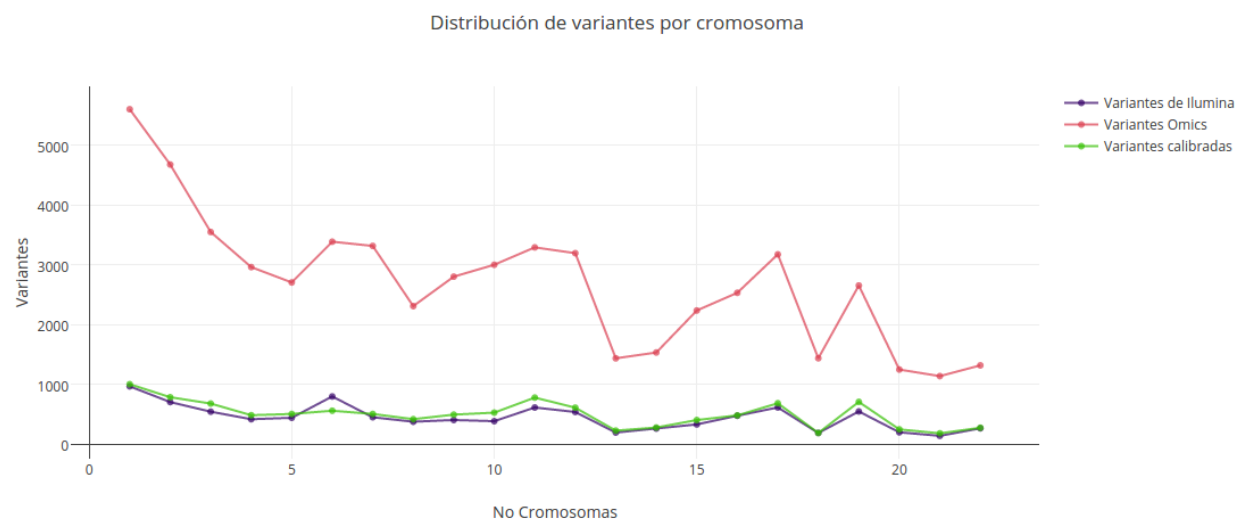


Figura 3.6: Distribución de variantes a lo largo de los cromosomas

Se observa la distribución de las variantes a lo largo del genoma, inicialmente las variantes obtenidas son en grandes cantidades para el modulo de omics, pero conservan el patrón de

distribución es similar para los tres casos, incluso cuando se realiza el hard filter en las diferencias en cuanto a la distribución de las variaciones es similar, siendo la mayor para el cromosoma 1 y la menor para el cromosoma Y.

Al realizar la comparación entre los dos archivos vcf se obtuvieron los siguientes resultados los archivos vcf de Illumina y los de Omics comparten 49.4 % y 44.0 % de las variantes, y difieren entre un 50.6 % para Illumina y 56.0 % para los datos de omics pipe. Como se refleja en el siguiente diagrama (3.7):

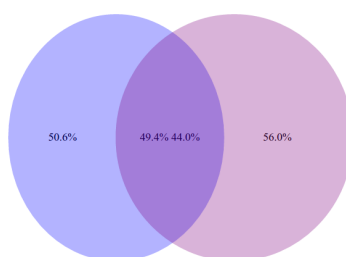


Figura 3.7: Diagrama de relación entre variantes comunes de Omics y de Illumina

Variantes de exoma vs variantes de omics

Una vez obtenidas las regiones se realizó el proceso de hard filtering para el vcf obtenido por el pipe de omics y por el generado por vcftools teniendo los siguientes resultados mostrados por la tabla **3-3**:

	Variantes Exoma			
	SNP	Indels	Desconocida	Total
Variantes Omics	30893	3324	0	34217
Variantes Públicas	29749	3101	0	32850

Tabla 3-3: Tabla de Variantes obtenidas a partir de un exoma.

Donde se observa una diferencia de 1367 en el total de las variantes encontradas, para los SNPs se encuentra una diferencia de 1144 y 223 para los indels, no se encuentran variantes que no hayan sido correctamente identificadas. Presentado en los siguientes gráficos 3.9

La distribución de las variantes a lo largo de los cromosomas se presenta en la siguiente tabla 3.8:

Cromosoma	Variantes publicas	Variantes Omics
1	3329	3438
2	2483	2586
3	1887	1906
4	1497	1546
5	1358	1377
6	1489	1540
7	1581	1658
8	1088	1111
9	1514	1595
10	1406	1529
11	2183	2256
12	1669	1698
13	720	736
14	1044	1111
15	1192	1230
16	1294	1372
17	1781	1921
18	545	607
19	2001	2060
20	807	820
21	490	500
22	755	795
X	737	755

Figura 3.8: Distribución de variantes a lo largo de los cromosomas para los exomas.

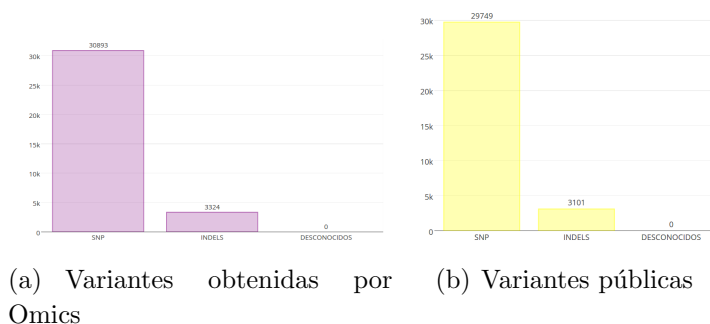


Figura 3.9: Variaciones de la muestras dentro del exoma

Y la representación gráfica de las variantes sobre la distribución a lo largo de los cromosomas figura 3.10:

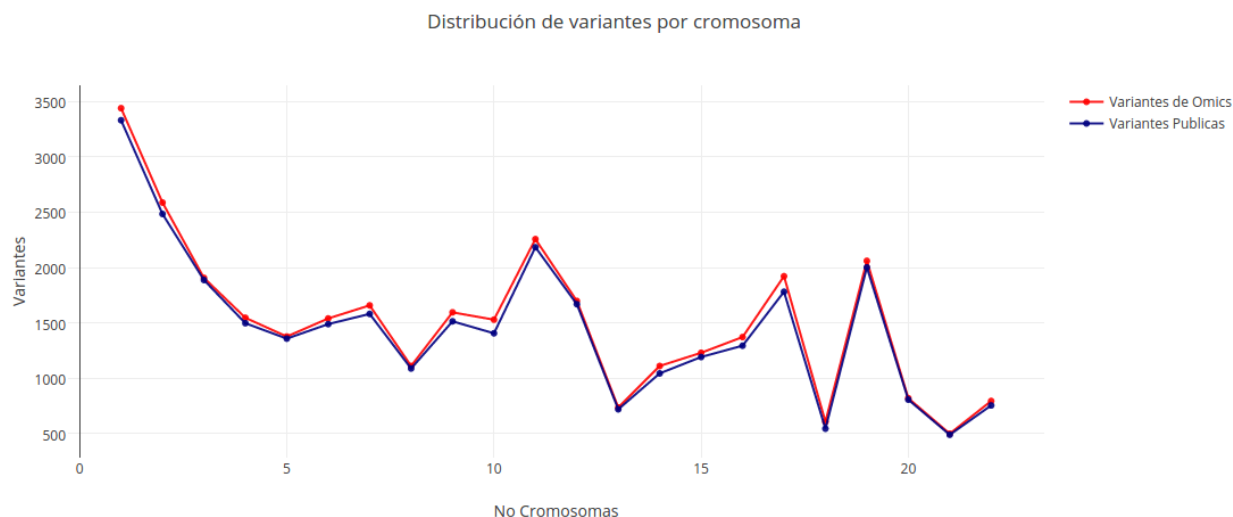


Figura 3.10: Distribución de variantes a lo largo de los cromosomas para los exomas

En la figura 3.10 se observa el comportamiento de la distribución de las variantes para los datos públicos y los datos obtenidos para el pipeline donde se encuentran un comportamiento similar de la distribución, pero se observa que aún hay una mayor cantidad de variantes obtenidas por el pipeline. En la siguiente figura se observa el comportamiento de las variantes públicas con respecto a las variantes del pipeline.

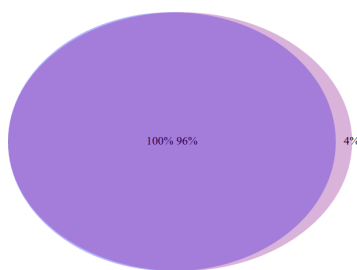


Figura 3.11: Diagrama de relación entre las variantes publicas y las obtenidas por el pipeline

El diagrama de la figura 3.11 muestra la comparación de las variantes obtenidas y su respectiva concordancia donde el 100 % del exoma esta representado en las variaciones encontradas mientras que un 96 % de las variaciones obtenidas por omicspipe son un 96 % dejando solo un 4 % de las variantes no encontradas dentro del exoma publico.

GATK realiza un reporte de la evaluación cuando se comparan dos archivos de distintas variaciones, este puede ser abierto como un archivo de texto o cargado directamente en R utilizando la librería *gsalib* quien lee el archivo *merged.eval.gatkreport*, esto genera una lista que tiene anidados varios data.frame, dentro de ellos para este caso se tomo el *Validation-Report*) que genera una tabla con los falsos positivos, falsos negativos, calcula la sensibilidad

y la especificidad y el valor predictivo positivo (PPV). Que para nuestro caso de nuestro exoma se encuentran en la tabla **3-4**:

TP	FP	FN	TN
32110	0	1033	0

Tabla 3-4: Tabla de validación 1.

La tabla **3-4** refleja que para el conjunto de datos no hay falsos positivos ni verdaderos negativos, pero si falsos negativos, es decir 1033 variantes del conjunto de datos obtenidos. (*GATK para calcular estas métricas compara contra una base de datos que el usuario disponga para determinar variantes existentes*). La tabla **3-5** muestra la sensibilidad, especificidad y el valor predictivo positivo (PPV).

Sensibilidad	Especificidad	PPV
96.88	100	100

Tabla 3-5: Tabla de validación 2.

Donde se tiene que existe una sensibilidad de 96.88 %, una especificidad del 100 % y un PPV de 100. Además después de la limpieza de los datos se realizó la anotación del archivo vcf obtenido, para el gen CYP2C19 utilizando la versión gráfica de annovar [47] y obteniéndose el siguiente resultado:

```
chr10,96541616,96541616,G,A,exonic,CYP2C19,synonymous SNV, CYP2C19:
NM_000769:exon5:c.G681A:p.P227P
```

La representación escrita informa el cromosoma, la posición dentro del genoma y el cambio de posición en el genoma, las siguiente es el cambio Guanina por Citocina (representado por sus letras) tipo de variación que en este caso es sinónima, el nombre del gen, su identificador, ubicación exonica y cambio en la posición del exón, finalmente se tiene el cambio en la proteína (No sigue exactamente la nomenclatura de HGVS), esta variación se confirmó también realizando la visualización por medio de la herramienta IGV conectado al clúster.

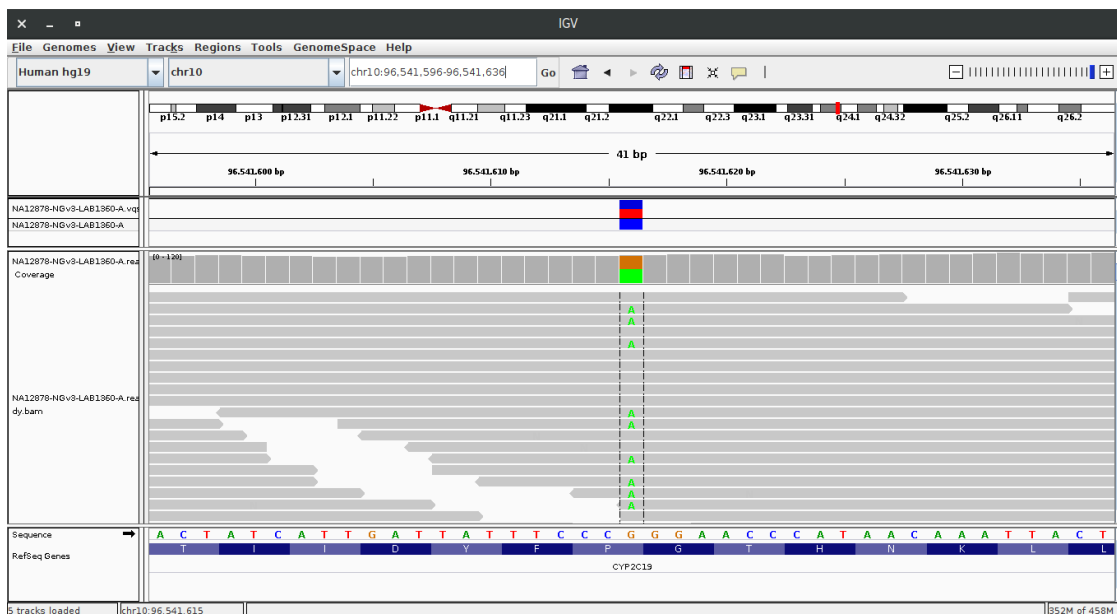


Figura 3.12: Imagen de la variante presenten en el exoma público

3.5. Discusión

Preprocesamiento

La revisión de las metrices dadas por el FASTQC report muestran el estado de como están las secuencias antes de ser procesadas, aunque a nivel experimental no dependiendo de las condiciones y el tipo de muestra los niveles de calidad terminan bajando de manera sustancial y depende del analista tomar la decisión de remover secuencias o mantenerlas ya que los diferentes módulos presentan diversas meticas de evaluación de las secuencias [46].

El presente conjunto de secuencias FASTQ se encuentra con buenos parametros de calidad, aunque algunos modulos presentan falla, el percentil, el porcentaje de GC, la distribución del largo de las secuencias, los niveles de duplicación de las secuencias y los valores de K-mer y las secuencias en secuencias cortas de 7 nucleótidos, representan que dentro del conjunto de datos estas secuencias cortas están en la parte inicial de la mayoría de las lecturas obtenidas en la muestra y que posiblemente son secuencias duplicadas que no pertenecen al conjunto de secuencias real, apesar de que no se encuentran adaptadores, ni representaciones al final de las lecturas. Esto puede llevar a dos caminos, el primero que estas secuencias sean parte de un adaptador (llama la atención que no se encuentren al final de la secuencia) o que sean errores propios del proceso de secuenciación durante la hibridación de las secuencias y sean representados como duplicaciones de las secuencias originales [46][48].

Además existen otras características que pueden generar impactos negativos dentro del análisis de datos de NGS divididas en dos grupos [49]:

1. Lecturas con baja calidad: Las calidades de las lecturas generadas por un secuenciador pueden degradarse durante el proceso de corrido y es común ver fallas al final de la lectura o tener secuencias duplicadas a partir de la amplificación por PCR durante la construcción de las librerías [49].
2. Contaminación de las lecturas de especies conocidas o no conocidas en la secuencia objetivo, este error es frecuente y puede ser causado por un experimento artificial durante la preparación de la muestra, la construcción de la librería o otro paso experimental, sin embargo las muestras de ADN pueden contener algunos nucleótidos de otras especies, las cuales son difíciles de excluir de manera experimental y por lo tanto si se cree que hay una contaminación lo ideal es realizar un trimming de las secuencias para remover la contaminación. **Nota:** Siempre y cuando estén en una baja proporción [49].

Las secuencias que se observan pueden ser duplicados de PCR que son un problema crítico cuando los fragmentos están sobre amplificados durante la preparación de las librerías, estos duplicados pueden aumentar la frecuencia alélica e incluir una detección errónea de variantes, esto es muy común en los datos de metagenómica, pero en nuestro caso los datos no son datos de metagenómica sino de un solo individuo llama la atención de que solo estén al inicio de las lecturas y que al final de las lecturas este adecuado esto podría indicar que más que un duplicado de PCR pueda ser un error de secuenciación al inicio de cada nuevo ciclo.[50].

Teniendo en cuenta lo anterior se puede inferir que las secuencias duplicadas son bajas y que la calidad de los datos obtenidos son adecuados para continuar con el procesamiento de las secuencias FASTQ, dentro del pipeline se cuenta con una herramienta para remover las secuencias duplicadas (PICARD) y así obtener una calidad óptima de los datos.

Variantes obtenidas

Variantes de illumina y omics pipeline

En los datos obtenidos para illumina inicialmente reflejados en la tabla **3-2**, muestran una alta discordancia ya que inicialmente las variantes no se les aplicó un segundo filtro, siguiendo las recomendaciones de GATK, donde por el pipeline de Omics tiene por defecto el variant quality score recalibration (VQRS) que se basa en machine learning para filtrar las variantes y generar una alta sensibilidad verdadera, que es el método más recomendado, pero tiene limitaciones estadísticas y es más robusto que el hard filtering, este es recomendado para datos pequeños [43].

Al realizar una calibración de los datos con la calidad y con hard filtering en GATK se obtiene una similitud entre la cantidad de variantes obtenidas por omics con respecto a Illumina, pero aún es posible ver que la distribución de las variantes es similar para ambos conjuntos de datos (véase la figura 3.6) y se acerca más después de realizar el filtrado. Esto se presenta debido a que no existe una fórmula para determinar cuáles anotaciones y filtros son adecuados, además el VQSR genera datos de entrenamiento para determinar las variaciones y se hacen recomendaciones según lo que se ha observado empíricamente dentro del desarrollo de los algoritmos [43].

A pesar de que la distribución de las variantes es similar, aun con el filtrado de las variantes existe que la concordancia entre ambas técnicas tiende a ser del 50 % (véase la figura 3.7), aunque Illumina utiliza GATK la versión implementada es la 1.6 que en este momento no cuenta con documentación (<https://www.broadinstitute.org/gatk/guide/version-history>) que Illumina utiliza la versión 1.6 y la función UnifiedGenotyper que presenta algunas inconsistencias para la identificación de indels, mientras que la versión de GATK 3.5 utiliza la función HaplotypeCaller que mejora el llamado de variantes, y corrige algunas inconsistencias para la identificación de indels [51]. Además es la función recomendada para organismos diploides, este se enfoca en dos tipos de identificación inicialmente los SNPs y los indels, y puede identificar cuando hay varios tipos de variantes cercanas a otras [43].

Illumina no provee los parámetros utilizados para hacer el llamado de variantes lo que dificulta la comparación entre este pipeline y las variantes reportadas por Illumina, además el formato del VCF es el 4.1 y en la mayoría de las variantes no reporta el valor de la Qual (calidad) para hacer un filtro con el archivo aunque para GATK los valores para el llamado de variantes no son modificados de manera significativa si se realiza un filtro de este tipo [2]. Además de que la combinación de BWA con HaplotypeCaller, presentan una mejora con respecto a la identificación de SNPs (BWA-mem) y HaplotypeCaller para la identificación de indels [45].

Variantes con un exoma NA12878.

Para este estudio se utilizó una muestra del genoma completo de la muestra NA12878 son de 34,886 variaciones [45] en el presente estudio 32850 y el pipeline obtuvo un total de 34217, lo que permite inferir que las variantes identificadas son solo de 2036 variaciones (dependiendo de las muestras y los genes que fueron secuenciados) y que se realizó un muestreo partir de un archivo bed. Además si se aplica un filtro para retirar las variaciones con baja calidad, el llamado de variantes de GATK mejora de manera significativa si necesidad de hacer cambios en el procesamiento de los datos [52].

Los dos resultados presentan una distribución similar en cuanto a las variantes por cromoso-

ma y no hay variantes desconocidas dentro de la muestra, esto se debe a la alta curación que tiene este exoma, la figura 3.10 presenta la distribución a lo largo de los cromosomas donde se presenta leves diferencias entre los datos públicos y los datos generados por el pipeline con una diferencia del 4 % entre los dos resultados, no existen falsos positivos ni verdaderos negativos identificados dentro del conjunto de los datos del pipeline, se presenta una sensibilidad del 96 % que es alta, dado que las calibraciones y los algoritmos presentan falencias reales para la identificación de variantes [43]. Esto se puede corregir por dos vías, aplicando un filtro de Quality by Depth (QD) ≥ 4 and Fisher Strand Bias (FS) ≥ 30 para dar un balance a la sensibilidad y la especificidad [53] o aplicando múltiples pipelines.

La no existencia de falsos negativos y verdaderos positivos, esta supeditada al hecho de que se tomó una muestra de las muestras comunes, es decir que tanto en la muestra a comparar con la obtenida se van a ver las posiciones entre los datos analizados, aún con esta limitante acerca de la posición de las variantes en la región genómica se logra ver el error que se está obteniendo dentro del pipeline, aunque la precisión es alta y no hay false discovery rate (FDR).

La sensibilidad de un solo pipeline está en promedio de 95 % al 99 %, que está dentro del rango de aceptabilidad para la identificación de las variantes [54]. Para nuestro pipeline tenemos una precisión de 100 %. Lo que muestra que hay baja probabilidad de error.

Al realizar la anotación se logró encontrar una de las variantes reportadas para el exoma, en el gen CYP2C19 en la misma posición reportada, con la misma variación mostrando la concordancia entre los resultados del pipeline y la muestra original.

Para ambos estudios se presentan archivos intermedios de gran tamaño como son los bam y bai que permiten la visualización de las variantes que pesan entre 6 y 15 gigas para un exoma completo, los datos iniciales pueden pesar entre 1 y 3 gigas (fastq) dependiendo de la cantidad de genes que se hallan secuenciado, lo que requiere de la disponibilidad de un computador para su almacenamiento y procesamiento.

3.6. Conclusiones

La validación de un pipeline para la identificación de variantes requiere la utilización de herramientas computacionales de HPC para hacerse de manera eficiente. Es necesario que se tengan conocimientos de programación básica y biología molecular, con el fin de definir los parámetros óptimos para la implementación un pipeline.

La cantidad de herramientas y parámetros para aplicar son diversos y dependen del investigador decidir cuáles son los mejores y qué filtros van a ser utilizados, dado que a pesar de la existencia de protocolos no hay un consenso de cuál o cuáles son los mejores y estos

dependen del conjunto de datos obtenido.

El llamado de variantes es bueno para el presente estudio, pero hay la posibilidad de mejorar la implementación de los parámetros de filtrado y el proceso de anotación (implicación del cambio de las variantes), además generar un pipeline alternativo para la verificación de las variantes que están siendo identificadas y poder aumentar la sensibilidad.

Es necesario crear o generar la manera de optimizar los tiempos de ejecución de las tareas, de una manera más eficiente a la dada por el omics pipe.

Resumen

Se realizó la implementación y validación de un pipeline para la identificación de variantes a partir de secuencias de exomas a partir de muestras de pacientes colombianos y del genoma público de la muestra NA12878 donde se identificaron las variantes que presentes en el mismo, teniendo en cuenta las buenas prácticas para el análisis de variantes lo que permitió desarrollar un mecanismo para obtener variantes de buena calidad.

4 Sistema de información

4.1. Introducción

Las nuevas tecnologías de análisis genético son fáciles y económicas de hacer lo que genera una gran cantidad de datos biológicos y lo que hace que los biólogos trabajen cada vez más con las nuevas tecnologías de análisis genético, haciendo que los biólogos trabajen más y más computacionalmente. Especialmente mediante el uso de tecnologías de secuenciación (NGS) y presentar un reto para integrar y almacenar la información, pasos que son necesarios para su posterior análisis [5, 55].

La gran cantidad de datos presentan un reto para organizar y manejar datos que crecen de manera exponencial y que son de diversos tipos, dado que los datos son generados a diferentes niveles y con diferentes métodos (ejemplo: Variantes de exones o imágenes de patología), datos que a su vez deben ser almacenados en distintas formas, esta situación muestra una seria dificultad para realizar un análisis integral de los datos [55, 5].

El mayor de los retos es crear herramientas que permitan al investigador acceder a la información fácilmente y que pueda tener una base de datos intercalable, donde pueda consultar, analizar y actualizar la información de sus experimentos [5].

En el campo clínico esto representa un reto aun mayor dado que se hace necesario recolectar los datos genéticos junto con los datos clínicos para poder hacer análisis más acertados y a gran escala [56].

El problema de la heterogeneidad de los datos se aplica igualmente a los datos clínicos que describen pacientes individuales y además a los datos biológicos que caracterizan nuestro genoma. Específicamente, las bases de datos son altamente heterogéneas con respecto a los modelos de datos que emplean, los esquemas de datos que especifican, los lenguajes de consulta que soportan y las terminologías que reconocen [57].

Por ello se hace necesario que se utilicen herramientas para la gestión de la información, por ejemplo django que es un web framework de alto nivel desarrollado en python fomenta el desarrollo rápido y limpio, para la creación de aplicaciones web, es de código abierto y gratuito. Se basa en los principios de desarrollo rápido, manejo de la seguridad y es altamente escalable .

Dentro de las muchas aplicaciones que tiene django una es el manejo y gestión de bases de datos a través de los módulos de python. Ver documentación <https://www.djangoproject.com/>.

4.2. Metodología

Nosotros a continuación proponemos la utilización de una base de datos con la información clínica disponible y las anotaciones de variantes obtenidas por medio de un pipeline validado previamente para la anotación de variantes, basado en la propuesta de Fisch y colaboradores en 2014 [10] y anotados con annovar web service [47]. Las historias clinicas fueron transcritas manualmente y cargadas desde un archivo de texto plano con un formato específico.

Se genero una base de datos utilizando Django 1.10 en python 3 y la librería grappelli, que se conectan a MySQL 5.7.17 desde un PC portatil HP-pavilion 360 con ubuntu 16.04 LTS. Django genera los modelos de EER pero permite su modificación para optimizar la velocidad de las consultas.

4.3. Resultados

Los resultados obtenidos fueron una aplicación con una interfaz que permite a los usuarios con poco conocimiento de programación analizar los datos de variantes y su resumen de la historia clínica.

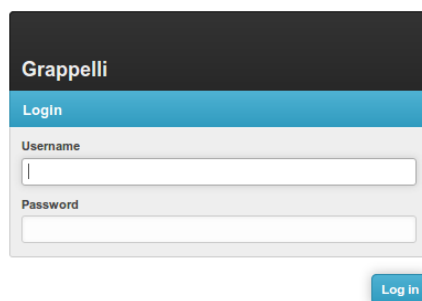


Figura 4.1: Interfaz de ingreso para administrar la base de datos.

Inicialmente la figura (4.1), muestra la solicitud de usuario y contraseña para acceder a la aplicación, es diferente a la base de MySQL que puede tener una contraseña igual o diferente a la interfaz gráfica .

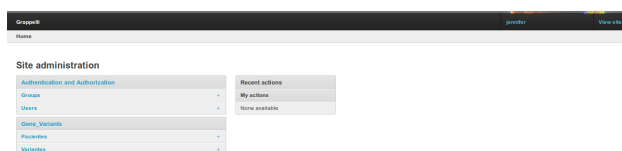


Figura 4.2: Interfaz de administración.

La figura (4.2), muestra el sitio de administración donde se encuentran los usuarios permitidos, las bases de datos a consultar y muestra un histórico de las actividades recientes.

Desde esta interfaz se puede agregar un grupo, más usuarios y pacientes y/o variantes dando click en el signo más sin necesidad de hacer la carga directa a MySQL ya que Django se encarga de hacer la carga.

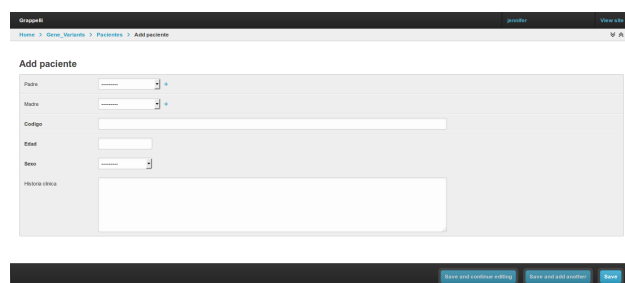


Figura 4.3: Ingreso de pacientes.

En la figura (4.3) se muestra el formulario para ingresar una nueva historia o de modificar una historia clínica de un paciente de manera manual.

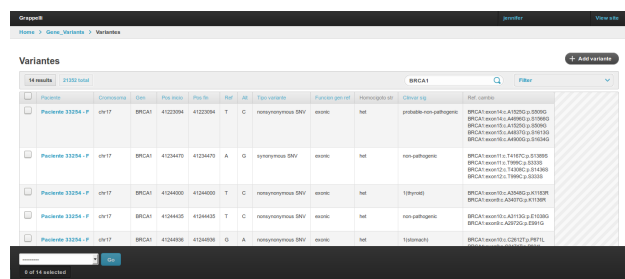


Figura 4.4: Consulta a variantes

La figura (4.4) muestra una consulta de las variantes que se tienen cargadas en la base de datos para el gen BRCA1, donde nos muestra una consulta de las variantes con su anotación filtrada mediante un script de python antes de cargar las anotaciones de la tabla obtenida por annovar para cada paciente. Desde esta misma interfaz se puede hacer consultas de pa-

cientes que se deben eliminar, en la parte inferior se encuentra la opción.

Si se desea hacer modificaciones a los datos del paciente también es posible hacerlo desde esta misma interfaz seleccionando el código del paciente, que lleva a la tabla de `genes_varante_paciente` que contiene el formulario de la historia clínica con los datos cargados para ser modificados.

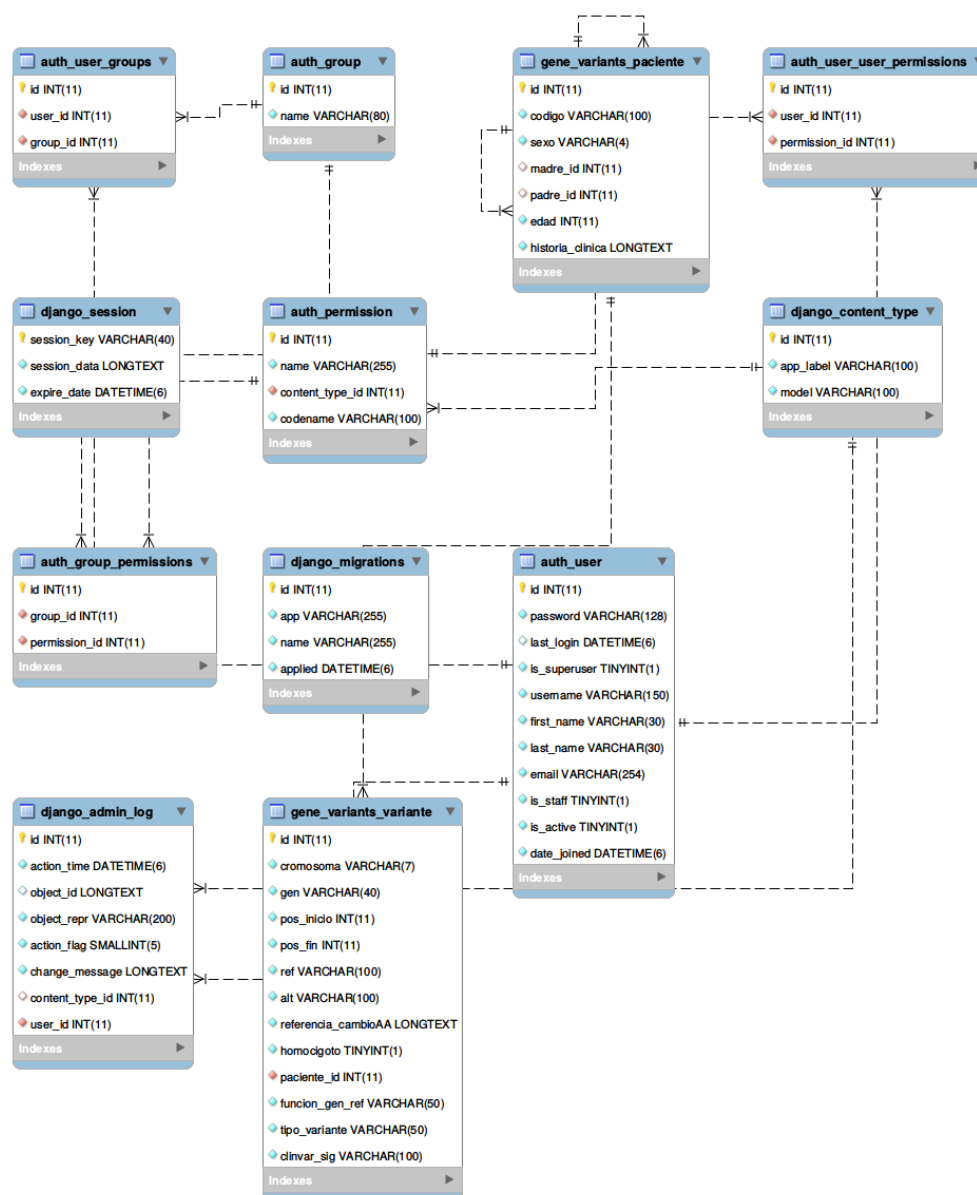


Figura 4.5: Modelo entidad relación

La figura (4.5) muestra el modelo EER que se genero en la base de datos MySQL, donde se muestra el modelo EER que muestra las tablas generadas por la aplicación para crear

la base de datos donde se incluyen las tablas de para la gestión del las variantes junto con la historia clínica y se tiene encuentra la posible relación parental, padre, madre e hijo, el control de las consultas de la variantes indexadas y dentro de la misma base la gestión de accesos a otros usuarios con sus permisos.

4.4. Discusión

4.4.1. Gestión de datos biológicos

La importancia de gestión aplicada al manejo de datos clínicos y de información genética es de vital importancia dado que existen miles de anotaciones que requieren de scripts para cargarlos las anotaciones y como es este caso el historial clínico del paciente [56].

La aplicación desarrollada para crear y gestionar una base de datos aplicada una bioinformática con aplicaciones a la medicina, es necesario que la base de datos provea las consultas para soportar las decisiones sobre un paciente en específico teniendo en cuenta sus datos, la relación con datos de otros pacientes y los datos de exomas, además de los datos relacionados con los familiares en caso de que se encuentren estos datos. Mostrando que es posible realizar una integración adecuada de los datos bioinformáticos y clínicos utilizando bases de datos relacionales, con una buena respuesta en las consultas. [57].

4.5. Conclusión

La utilización de aplicaciones en Django permite que un bioinformático diseñe e implemente bases de datos aplicadas al diagnóstico clínico, donde se puede guardar y gestionar toda la información obtenida de un paciente, lo que permite hacer análisis a profesionales Médicos y biólogos fácilmente. Una vez ha sido implementada la base de datos también es posible aplicar técnicas de minería de datos para optimizar los análisis de los pacientes.

5 Capítulo 3

Se deben incluir tantos capítulos como se requieran; sin embargo, se recomienda que la tesis o trabajo de investigación tenga un mínimo 3 capítulos y máximo de 6 capítulos (incluyendo las conclusiones).

6 Capítulo ...

Se deben incluir tantos capítulos como se requieran; sin embargo, se recomienda que la tesis o trabajo de investigación tenga un mínimo 3 capítulos y máximo de 6 capítulos (incluyendo las conclusiones).

7 Conclusiones y recomendaciones

7.1. Conclusiones

Las conclusiones constituyen un capítulo independiente y presentan, en forma lógica, los resultados de la tesis o trabajo de investigación. Las conclusiones deben ser la respuesta a los objetivos o propósitos planteados. Se deben titular con la palabra conclusiones en el mismo formato de los títulos de los capítulos anteriores (Títulos primer nivel), precedida por el numeral correspondiente (según la presente plantilla).

7.2. Recomendaciones

Se presentan como una serie de aspectos que se podrían realizar en un futuro para emprender investigaciones similares o fortalecer la investigación realizada. Deben contemplar las perspectivas de la investigación, las cuales son sugerencias, proyecciones o alternativas que se presentan para modificar, cambiar o incidir sobre una situación específica o una problemática encontrada. Pueden presentarse como un texto con características argumentativas, resultado de una reflexión acerca de la tesis o trabajo de investigación.

Bibliografía

- [1] Emad a. Mohammed, Behrouz H. Far, and Christopher Naugler. Applications of the MapReduce programming framework to clinical big data analysis: current landscape and future trends. *BioData Mining*, 7(1):1–23, 2014.
- [2] Sohyun Hwang, Eiru Kim, Insuk Lee, and Edward M. Marcotte. Systematic comparison of variant calling pipelines using gold standard personal exome variants. *Scientific Reports*, 5(December):17875, 2015.
- [3] Jiaxin Wu, Yanda Li, and Rui Jiang. Integrating Multiple Genomic Data to Predict Disease-Causing Nonsynonymous Single Nucleotide Variants in Exome Sequencing Studies. *PLoS Genetics*, 10(3), 2014.
- [4] Madhuri Hegde, Avni Santani, Rong Mao, Andrea Ferreira-Gonzalez, Karen E. Weck, and Karl V. Voelkerding. Development and validation of clinical whole-exome and whole-genome sequencing for detection of germline variants in inherited disease. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 141(6):798–805, 2017.
- [5] Yixue Li and Luonan Chen. Big Biological Data: Challenges and Opportunities Expanding volume of the big biological data and its bonanza. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 12(5):187–189, 2014.
- [6] David Lauzon, Beatriz Kanzki, Victor Dupuy, Alain April, Michael S. Phillips, Johanne Tremblay, and Pavel Hamet. Addressing Provenance Issues in Big Data Genome Wide Association Studies (GWAS). *Proceedings - 2016 IEEE 1st International Conference on Connected Health: Applications, Systems and Engineering Technologies, CHASE 2016*, pages 382–387, 2016.
- [7] Coriell Institute. 1000 genomes project.
- [8] Juan Felipe Arias-blanco, Dora Janeth Fonseca-mendoza, and Oscar Gamboa-garay. FRECUENCIA DE MUTACIÓN Y DE VARIANTES DE SECUENCIA PARA LOS GENES BRCA1 Y BRCA2 EN UNA MUESTRA DE MUJERES COLOMBIANAS CON SOSPECHA DE SÍNDROME DE CÁNCER DE MAMA HEREDITARIO: SERIE DE CASOS. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 65(4):287–296, 2015.

-
- [9] Quan Li and Kai Wang. InterVar: Clinical Interpretation of Genetic Variants by the 2015 ACMG-AMP Guidelines. *American Journal of Human Genetics*, 100(2):267–280, 2017.
 - [10] Kathleen M Fisch, Tobias Meißner, Louis Gioia, Jean Christophe Ducom, Tristan M Carland, Salvatore Loguercio, and Andrew I Su. Omics Pipe: A community-based framework for reproducible multi-omics data analysis. *Bioinformatics*, 31(11):1724–1728, 2015.
 - [11] Curtis Huttenhower and Oliver Hofmann. A quick guide to large-scale genomic data mining. *PLoS Computational Biology*, 6(5):1–6, 2010.
 - [12] Stephan Pabinger, Andreas Dander, Maria Fischer, Rene Snajder, Michael Sperk, Mirjana Efremova, Birgit Krabichler, Michael R. Speicher, Johannes Zschocke, and Zlatko Trajanoski. A survey of tools for variant analysis of next-generation genome sequencing data. *Briefings in Bioinformatics*, 15(2):256–278, 2014.
 - [13] Merina Maharjan. Genome Analysis with MapReduce. pages 1–23, 2011.
 - [14] Fady Hannah-Shmouni, Sara B. Seidemann, Sandra Sirrs, Arya Mani, and Daniel Jacoby. The Genetic Challenges and Opportunities in Advanced Heart Failure. *Canadian Journal of Cardiology*, 31(11):1338–1350, 2015.
 - [15] Brenton Louie, Peter Mork, Fernando Martin-Sanchez, Alon Halevy, and Peter Tarczy-Hornoch. Data integration and genomic medicine, feb 2007.
 - [16] James D Watson and Francis H C Crick. Molecular structure of nucleic acids, 1953.
 - [17] Angel Herráez. *Biología Molecular e Ingeniería Genética*. 2^a ed. Elsevier Ltd, Barcelona, 2012.
 - [18] Pei Hui. Next Generation Sequencing: Chemistry, Technology and Applications. *Chemical Diagnostics Topics in Current Chemistry*, 336(1):1–18, 2012.
 - [19] Jerzy K. Kulski. Next-Generation Sequencing — An Overview of the History, Tools, and “Omic” Applications. In *Next Generation Sequencing - Advances, Applications and Challenges*. InTech, jan 2016.
 - [20] Joachim Kutzera and Patrick May. Data Integration in the Life Sciences. 6254:22–28, 2017.
 - [21] Illumina. Whole Exome Sequencing — Detect exonic variants, 2017.
 - [22] William S. Klug and Luis F. Pascual Calaforra. *Conceptos de gennética*. Pearson Educacinón, 2013.

- [23] Eugenia Poliakov, David N Cooper, Elena I Stepchenkova, and Igor B Rogozin. Genetics in genomic era. *Genetics research international*, 2015:364960, 2015.
- [24] Xutao Deng. SeqGene: a comprehensive software solution for mining exome- and transcriptome- sequencing data. *BMC bioinformatics*, 12:267, jun 2011.
- [25] Jay Shendure. Human genomics: A deep dive into genetic variation. *Nature*, 536(7616):277–278, aug 2016.
- [26] T. Triplet and G. Butler. A review of genomic data warehousing systems. *Briefings in Bioinformatics*, 15(4):471–483, jul 2014.
- [27] Gabriela Jurca, Omar Addam, Alper Aksac, Shang Gao, Tansel Özyer, Douglas Demetrick, and Reda Alhajj. Integrating text mining, data mining, and network analysis for identifying genetic breast cancer trends. *BMC Research Notes*, 9(1):236, 2016.
- [28] Vito Terlizzi, Giuseppe Castaldo, Donatello Salvatore, Marco Lucarelli, Valeria Raia, Adriano Angioni, Vincenzo Carnovale, Natalia Cirilli, Rosaria Casciaro, Carla Colombo, Antonella Miriam, Di Lullo, Ausilia Elce, Paola Iacotucci, Marika Comegna, Manuela Scorza, Vincenzina Lucidi, Anna Perfetti, Roberta Cimino, Serena Quattrucci, Manuela Seia, Federica Zarrilli, and Felice Amato. Genotype – phenotype correlation and functional studies in patients with cystic fi brosis bearing CFTR complex alleles. pages 224–235, 2017.
- [29] Rayan Littlefield. An introduction into Data Mining in Bioinformatics.
- [30] David B. Searls. The Roots of Bioinformatics. *PLoS Computational Biology*, 6(6):e1000809, jun 2010.
- [31] Ibrahim Abaker Targio Hashem, Ibrar Yaqoob, Nor Badrul Anuar, Salimah Mokhtar, Abdullah Gani, and Samee Ullah Khan. The rise of "big data."n cloud computing: Review and open research issues. *Information Systems*, 47:98–115, jan 2015.
- [32] Guomin Ren and Roman Krawetz. Applying computation biology and "big data"to develop multiplex diagnostics for complex chronic diseases such as osteoarthritis. *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals*, 20(8):533–9, 2015.
- [33] S. T. Sherry, M.-H. Ward, M. Kholodov, J. Baker, L. Phan, E. M. Smigielski, and K. Sirotkin. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Research*, 29(1):308–311, jan 2001.
- [34] Andrew Yates, Wasiu Akanni, M Ridwan Amode, Daniel Barrell, Konstantinos Billis, Denise Carvalho-Silva, Carla Cummins, Peter Clapham, Stephen Fitzgerald, Laurent

- Gil, Carlos García Girón, Leo Gordon, Thibaut Hourlier, Sarah E Hunt, Sophie H Janacek, Nathan Johnson, Thomas Juettemann, Stephen Keenan, Ilias Lavidas, Fergal J Martin, Thomas Maurel, William McLaren, Daniel N Murphy, Rishi Nag, Michael Nuhn, Anne Parker, Mateus Patricio, Miguel Pignatelli, Matthew Rahtz, Harpreet Singh Riat, Daniel Sheppard, Kieron Taylor, Anja Thormann, Alessandro Vullo, Steven P Wilder, Amonida Zadissa, Ewan Birney, Jennifer Harrow, Matthieu Muffato, Emily Perry, Magali Ruffier, Giulietta Spudich, Stephen J Trevanion, Fiona Cunningham, Bronwen L Aken, Daniel R Zerbino, and Paul Flicek. Ensembl 2016. *Nucleic acids research*, 44(D1):D710–6, jan 2016.
- [35] Vincent Canuel, Bastien Rance, Paul Avillach, Patrice Degoulet, and Anita Burgun. Translational research platforms integrating clinical and omics data: A review of publicly available solutions. *Briefings in Bioinformatics*, 16(2):280–290, 2015.
- [36] Koichiro Higasa, Noriko Miyake, Jun Yoshimura, Kohji Okamura, Tetsuya Niihori, Hirotomo Saitsu, Koichiro Doi, Masakazu Shimizu, Kazuhiko Nakabayashi, Yoko Aoki, Yoshinori Tsurusaki, Shinichi Morishita, Takahisa Kawaguchi, Osuke Migita, Keiko Nakayama, Mitsuko Nakashima, Jun Mitsui, Maiko Narahara, Keiko Hayashi, Ryo Funayama, Daisuke Yamaguchi, Hiroyuki Ishiura, Wen-Ya Ko, Kenichiro Hata, Takeshi Nagashima, Ryo Yamada, Yoichi Matsubara, Akihiro Umezawa, Shoji Tsuji, Naomichi Matsumoto, and Fumihiko Matsuda. Human genetic variation database, a reference database of genetic variations in the Japanese population. *Journal of Human Genetics*, 61(6):547–553, 2016.
- [37] About the Human Variome Project: what we do and why we do it - Human Variome Project.
- [38] Hirak Kashyap, Hasin Afzal Ahmed, Nazrul Hoque, Swarup Roy, and Dhruba Kumar Bhattacharyya. Big Data Analytics in Bioinformatics: A Machine Learning Perspective. *Journal of Latex Class Files*, 13(9):1–20, 2014.
- [39] Ligia Bustos, Ricardo Moreno, and Nestor Duque. Modelo de una bodega de datos para el soporte a la investigación bioinformática. *Scientia*, XIII(037):13–18, 2007.
- [40] Stefan Naulaerts, Pieter Meysman, Wout Bittremieux, Trung Nghia Vu, Wim Vanden Berghe, Bart Goethals, and Kris Laukens. A primer to frequent itemset mining for bioinformatics. *Briefings in bioinformatics*, 36(2):3066–3076, 2013.
- [41] Mohammed J Zaki, George Karypis, and Jiong Yang. Data Mining in Bioinformatics (BIOKDD). *Algorithms for molecular biology : AMB*, 2:4, 2007.
- [42] Martine Tetreault, Eric Bareke, Javad Nadaf, Najmeh Alirezaie, and Jacek Majewski. Whole-exome sequencing as a diagnostic tool: current challenges and future opportunities. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2015.

- [43] Geraldine A Van Der Auwera, Mauricio O Carneiro, Chris Hartl, Ryan Poplin, Ami Levy-moonshine, Tadeusz Jordan, Khalid Shakir, David Roazen, Joel Thibault, Eric Banks, Kiran V Garimella, David Altshuler, Stacey Gabriel, and Mark A Depristo. *From FastQ data to high confidence variant calls: the Genomex Analysis Toolkit best practices pipeline*, volume 11. 2014.
- [44] Riyue Bao, Lei Huang, Jorge Andrade, Wei Tan, Warren a Kibbe, Hongmei Jiang, and Gang Feng. Review of Current Methods, Applications, and Data Management for the Bioinformatics Analysis of Whole Exome Sequencing. *Libertas Academica*, 13:67–82, 2014.
- [45] Adam Cornish and Chittibabu Guda. A Comparison of Variant Calling Pipelines Using Genome in a Bottle as a Reference. *BioMed Research International*, 2015(BioMed Research International):11, 2015.
- [46] Babraham Bioinformatics. FASTQC manual, 2016.
- [47] H Yang and K Wang. Genomic variant annotation and prioritization with ANNOVAR and wANNOVAR. *Nat Protoc*, 10(10):1556–1566, 2015.
- [48] Mehdi Pirooznia, Melissa Kramer, Jennifer Parla, Fernando S Goes, James B Potash, W Richard McCombie, and Peter P Zandi. Validation and assessment of variant calling pipelines for next-generation sequencing. *Human genomics*, 8(1):14, 2014.
- [49] Qian Zhou, Xiaoquan Su, Anhui Wang, Jian Xu, and Kang Ning. QC-Chain: Fast and Holistic Quality Control Method for Next-Generation Sequencing Data. *PLoS ONE*, 8(4), 2013.
- [50] Ram Vinay Pandey, Stephan Pabinger, Albert Kriegner, and Andreas Weinhäusel. ClinQC: a tool for quality control and cleaning of Sanger and NGS data in clinical research. *BMC Bioinformatics*, 17(1):56, 2016.
- [51] Jason O’Rawe, Tao Jiang, Guangqing Sun, Yiyang Wu, Wei Wang, Jingchu Hu, Paul Bodily, Lifeng Tian, Hakon Hakonarson, W Evan Johnson, Zhi Wei, Kai Wang, and Gholson J Lyon. Low concordance of multiple variant-calling pipelines: practical implications for exome and genome sequencing. *Genome medicine*, 5(3):28, 2013.
- [52] Charles D. Warden, Aaron W. Adamson, Susan L. Neuhausen, and Xiwei Wu. Detailed comparison of two popular variant calling packages for exome and targeted exon studies. *PeerJ*, 2:e600, 2014.
- [53] Ellen Tsai, Rimma Shakbatyan, Jason Evans, Peter Rossetti, Chet Graham, Himanshu Sharma, Chiao-Feng Lin, and Matthew Lebo. Bioinformatics Workflow for Clinical Whole Genome Sequencing at Partners HealthCare Personalized Medicine. *Journal of Personalized Medicine*, 6(1):12, 2016.

-
- [54] Xiangtao Liu, Shizhong Han, Zuoheng Wang, Joel Gelernter, and Bao Zhu Yang. Variant Callers for Next-Generation Sequencing Data: A Comparison Study. *PLoS ONE*, 8(9):1–11, 2013.
 - [55] Charles E. Cook, Mary Todd Bergman, Robert D. Finn, Guy Cochrane, Ewan Birney, and Rolf Apweiler. The European Bioinformatics Institute in 2016: Data growth and integration. *Nucleic Acids Research*, 44(D1):D20–D26, 2016.
 - [56] Umadevi Paila, Brad A. Chapman, Rory Kirchner, and Aaron R. Quinlan. GEMINI: Integrative Exploration of Genetic Variation and Genome Annotations. *PLoS Computational Biology*, 9(7), 2013.
 - [57] W Sujansky. Heterogeneous database integration in biomedicine. *Journal of biomedical informatics*, 34(2001):285–298, 2001.