



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO - BICOCCA

Scuola di Scienze

Dipartimento di Informatica, Sistemistica e Comunicazione

Corso di laurea in Informatica

**Inferenza di alberi tumorali tramite
Particle Swarm Optimization**

Relatore: Prof. Della Vedova Gianluca

Correlatore: Dott. Ciccolella Simone

Relazione della prova finale di:

Castro Tenemaya Adrian David

Matricola 816015

Anno Accademico 2016-2019

Indice

1	Introduzione	9
1.1	Descrizione	9
1.2	Storia	9
1.3	Nozioni di biologia	9
1.3.1	La cellula	9
1.3.2	Il DNA	10
1.3.3	Cancro e tumore	11
1.3.4	Eterogeneità Intra-Tumorale	11
1.4	Modelli di sostituzione	11
1.4.1	Single-Cell Sequencing	12
1.5	Richiami di ottimizzazione matematica	13
1.5.1	Hill climbing	13
1.5.2	Simulated Annealing	14
1.5.3	Particle Swarm Optimization	14
2	Stato dell'arte	17
2.1	Introduzione	17
2.2	SiFit: inferring tumor trees from single-cell sequencing data under finite-sites models	17
2.2.1	L'algoritmo	17
2.3	SciTe	17
2.4	SASC - Inferring Cancer Progression from Single-Cell Sequencing while Allowing Mutation Losses [2]	17
3	Inferenza di Alberi Tumorali tramite Particle Swarm Optimization	19
3.0.1	19

Premessa e ringraziamenti

Il presente lavoro è frutto del lavoro svolto come tirocinio all'interno dell'Università di Milano-Bicocca, e viene anche utilizzato come tesi finale ai fini del conseguimento della laurea in Informatica. È però necessario chiarire che il progetto in questione non sarà abbandonato nè una volta terminata la stesura di questa relazione, nè dopo il conseguimento della laurea. È mia intenzione contribuire al meglio delle mie possibilità in quello che ritengo essere uno dei campi con il quale mi sento più legato, sia a livello di interesse professionale, che a livello strettamente personale: la ricerca sul cancro. Secondo il *National Cancer Institute*, nel 2012 sono stati riportati 14.1 *milioni* di nuovi casi, e di questi, 8.2 *milioni* hanno portato alla morte [1]. I dati mostrano anche quelli che può sembrare all'apparenza una realtà discordante: il numero totale di morti per cancro è in crescita, ma il rapporto delle morti per individuo sta calando [5]. Nel 1990, 161 persone su 100.000 nel mondo sono morte a causa del cancro. Nel 2016, questo numero è calato a 134 su 100.000. Questo miglioramento è dovuto indubbiamente ad un numero molto elevato di fattori, tra cui l'aumento della qualità di vita ed un migliore sistema sanitario, ma è anche grazie alla crescita incessante della ricerca sul cancro, ed ai campi sui quali essa si appoggia. Lo sviluppo di algoritmi sempre più efficienti e performanti, e l'utilizzo di calcolatori super-veloci, ha permesso a questo settore di ricerca di ottenere dei considerevoli risultati.

Con questo progetto spero, quindi, di aver dato un contributo in questo settore, anche se in una percentuale minuscola.

Vorrei ringraziare mia mamma **Laura**, mio padre **José**, mia sorella **Valeria**, i miei fantastici nonni, le bellissime e meravigliose persone che hanno contribuito, in maniera diretta ed indiretta, a farmi appassionare all'informatica e, in questo caso, alla bioinformatica. Un importante ringraziamento va ad Erica e Valentina per avermi aiutato nella correzione del primo capitolo. Uno speciale ringraziamento va ad Iris.

Prefazione

Il presente lavoro è stato svolto sotto la guida ed il supporto di AlgoLab, laboratorio presso il dipartimento di informatica dell'Università di Milano-Bicocca, che ha lo scopo di progettare, studiare, analizzare ed implementare algoritmi efficienti per problemi computazionali. Il tirocinio è cominciato il 22 Marzo 2019, ed è stato condotto per la maggior parte in maniera autonoma, da remoto. Il problema affrontato è l'*inferenza di progressioni tumorali* su dati single-cell, al fine di determinare l'ordine e la frequenza con cui le variazioni somatiche vengono acquisite durante una progressione tumorale. Spesso ciò è basato sulla "Infinite Sites Assumption", dove le mutazioni possono solo essere acquisite, e mai perse. Lo stage si colloca nella ricerca del superamento di tale assunzione, utilizzando il modello della *filogenesi persistente*, dove ogni mutazione può essere persa al massimo una volta nell'intero albero. Più precisamente, si è investigata la tecnica *Particle Swarm Optimization*, un algoritmo di ottimizzazione di tipo euristico, ispirato al movimento degli sciami. I dati single-cell sono caratterizzati da un elevato tasso di errore e di valori mancanti: ciò rende inutilizzabili gli approcci noti in letteratura per i dati di *bulk sequencing*. In particolare, sono state analizzate quali strutture dati utilizzare per rendere l'algoritmo efficiente ed efficace, e quali operazioni considerare per inferire predizioni accurate.

Abstract

Al fine di ricostruire gli alberi filogenetici tumorali, negli ultimi anni si è fatto uso del modello *infinite-sites*, ipotizzando le progressioni tumorali come accumulazioni di mutazioni. Recenti studi che sfruttano la sequenziazione *single-cell* mostrano, evidenziando la presenza di perdite di mutazioni, come questa assunzione non si riveli sempre vera. La presenza di strumenti che possano fare inferenze sulle filogenesi di alberi genetici con perdite di mutazioni è però limitata.

In questo lavoro viene illustrato ed analizzato un nuovo strumento di analisi per l'inferenza di progressioni tumorali tramite *particle swarm optimization*.

Capitolo 1

Introduzione

1.1 Descrizione

Il cancro è la seconda causa più comune di morte [5], arrivando nel 2017 a contare il 17.08% delle morti nel mondo, per un totale di 8.93 *milioni* di decessi.

1.2 Storia

Era il 1869 quando venne isolato per la prima volta nella storia dell'umanità l'*Acido Desossiribonucleico*, anche conosciuto come *DNA*. Il pioniere di questa scoperta è Friedrich Miescher (Figura 1.1), medico e ricercatore nato in Svizzera nel 1844. Durante il processo di scoperta, Miescher aveva realizzato che nonostante avesse proprietà simili alle proteine, la nuova sostanza – il DNA – non lo era. Prima di isolare le cellule dal pus presente nelle bende chirurgiche dell'ospedale in cui lavorava, Miescher fu molto attento ad assicurarsi che il materiale che stava utilizzando fosse fresco e non contaminato. Fu solo più tardi, nel 1871, che il ricercatore iniziò a lavorare sullo sperma di salmone, una specie di pesce che affluiva numerosa durante il periodo autunnale nella città di Basel.



Figura 1.1: Friedrich Miescher

1.3 Nozioni di biologia

Al fine di poter comprendere appieno il lavoro svolto, in questa sezione verranno trattate nozioni base di biologia, partendo dalla cellula fino alla rappresentazione in modello del DNA in essa contenuta.

1.3.1 La cellula

Le cellule costituiscono le fondamenta di tutti gli organismi viventi. Il corpo umano è composto da trilioni di cellule. Esse danno forma al corpo, estraggono le sostanze nutritive

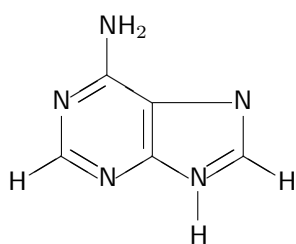
dal cibo, convertono quelle sostanze nutritive in energia, ed hanno delle funzioni specifiche. Le cellule contengono anche il materiale ereditario del corpo, e possono fare copie di loro stesse. Esse sono a loro volta costituite da diverse parti, tra le quali analizzeremo il nucleo e ciò che esso contiene, il DNA.

1.3.2 Il DNA

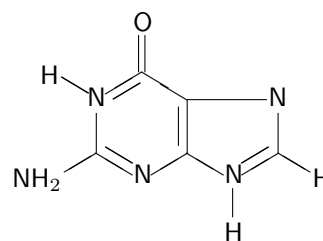
Il *DNA*, o *acido desossiribonucleico*, è il materiale ereditario degli organismi viventi presente in ogni cellula. La maggior parte del DNA è situato all'interno del nucleo della cellula (dove è chiamato *DNA cellulare*), ma può trovarsi anche all'interno dei mitocondri, organelli addetti alla respirazione cellulare. Le informazioni nel DNA sono conservate come un codice composto da quattro basi azotate: **adenina** (A) (Figura 1.3a), **guanina** (G) (Figura 1.3b), **citosina** (C) (Figura 1.3c), e **timina** (T) (Figura 1.3d). L'ordine, o la sequenza, di queste basi determina le informazioni disponibili per costruire e mantenere operativo un organismo.



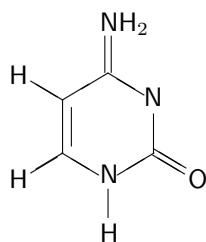
Figura 1.2: Il DNA



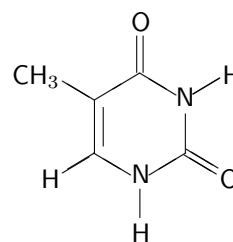
(a) Adenina (A)



(b) Guanina (G)



(c) Citosina (C)



(d) Timina (T)

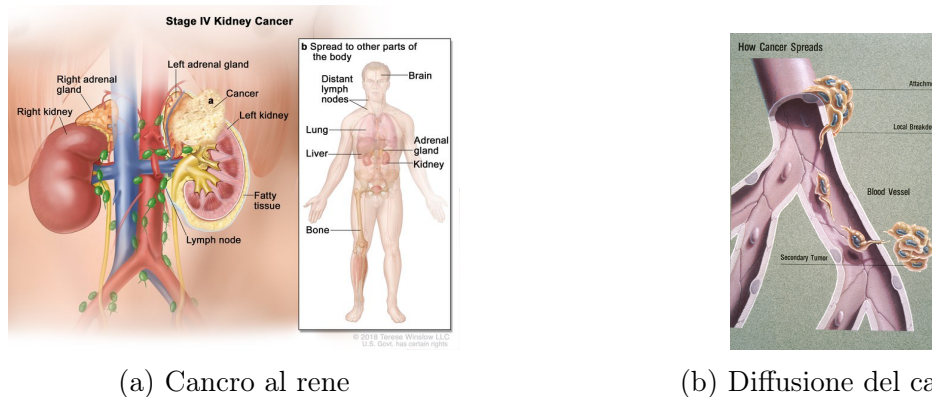
Figura 1.3: Basi azotate

Tali basi si combinano tra di loro, A con T e C con G, in maniera tale da formare una coppia. Assieme ad uno zucchero (*desossiribosio*) ed una molecola di fosfato, le basi costituiscono quello che è definito un *nucleotide*. I nucleotidi si organizzano in uno scheletro zucchero-fosfato che si dispone in modo tale da formare una struttura a *doppia elica*.

Un'importante proprietà del DNA è che si può replicare, ovvero fare copie di se stesso. Uno qualunque dei due filamenti può essere utilizzato nel processo di duplicazione per ottenere una copia identica del DNA di partenza. Questa è una fase cruciale nella divisione

di una cellula, poiché la nuova copia di essa deve avere lo stesso identico DNA della cellula di origine.

1.3.3 Cancro e tumore



(a) Cancro al rene

(b) Diffusione del cancro

Figura 1.4: Un cancro al rene ed un esempio di diffusione del cancro tramite vasi sanguigni

Si stima che durante la replicazione solo una base su 10^9 [3] sia errata. Vari fattori possono influenzare questa delicata fase, come l'esposizione ad agenti chimici ed irradiazione. Questi errori molto spesso sono corretti in vari modi, ma quando questo non basta, possono essere la causa scatenante che porta una cellula a diventare *cancerogena*. In generale, una cellula è cancerogena quando inizia a moltiplicarsi senza controllo. Quando questo processo avviene in un tessuto solido come un organo (Figura 1.4a), muscolo od ossa, prende il nome di *tumore*. Ci sono due tipi di tumore: *maligno* (cancerogeno) e *benigno* (non cancerogeno). I primi possono invadere i tessuti circostanti del corpo e, mentre crescono, alcune cellule possono viaggiare nel sangue (Figura 1.4b) o altri mezzi a formare delle *metastasi*, dei tumori secondari. I tumori benigni d'altro canto conservano le caratteristiche del tessuto di origine e non hanno la tendenza ad invadere gli organi circostanti. Un tumore benigno non è quindi un cancro, ma una massa che può raggiungere dimensioni considerevoli, senza diffondersi in altre parti del corpo.

1.3.4 Eterogeneità Intra-Tumorale

Durante la divisione di una cellula, sia essa sana o tumorale, questa può acquisire delle mutazioni. Nel caso di cellule tumorali o cancerogene, può capitare che le mutazioni avvengano in posizioni diverse nel DNA sia tra tumori dello stesso tipo, *eterogeneità inter-tumorale*, che tra cellule appartenenti allo stesso tumore, *eterogeneità intra-tumorale*. L'acquisizione di mutazioni è randomica e derivante dalla crescente instabilità genomica¹ di ogni nuova generazione. Questo rappresenta un grande problema dal punto di vista della diagnosi e della terapia di cura per il cancro [6].

1.4 Modelli di sostituzione

In filogenetica il DNA può essere rappresentato come una sequenza di simboli, utilizzando le basi (sottosezione 1.3.2) corrispondenti alle posizioni degli allineamenti come caratteri.

¹Elevata frequenza di mutazioni nel genoma di una discendenza cellulare

AGTCCAGGACAT GGCATTCAATCA

Figura 1.5: Esempi di sequenze di DNA

La Figura 1.5 rappresenta un esempio di *modello di sostituzione*, un modello che in biologia descrive il processo per cui una sequenza di simboli cambia in un'altra, modificandone i tratti che rappresenta. In cladistica² viene utilizzato per rappresentare delle caratteristiche presenti, utilizzando il carattere “1”, o assenti, utilizzando il carattere “0”, in una specie.

10011 01110

Figura 1.6: Esempio di modello di sostituzione in cladistica

L'esempio in Figura 1.6 può ipoteticamente rappresentare due specie: la prima può digerire i latticini, non depone uova, è una creatura a sangue freddo, vola e sa nuotare; la seconda non può digerire i latticini, può deporre uova, è una creatura a sangue caldo, vola e non sa nuotare. Lo stesso ragionamento può essere utilizzato per rappresentare le *mutazioni* presenti all'interno di una cellula nel caso di cellule tumorali (Figura 1.7).

BBS4	CAMSAP1	DOCK3	EPHA10	EYA4	HIPK4	HIST1H2AG	INTS8	MAL2	MYOM3	OAZ3	PPIG	PTPRQ	RGS11	RYR3	SERPINF2	SMOC1	TTN	TUFT1	ZNF540
1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0
1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0
0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1
0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1
0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1
1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0
0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1
1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0
0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1
:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1
1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0

Figura 1.7: Dataset di cellule tumorali e delle relative mutazioni

1.4.1 Single-Cell Sequencing

La *single-cell sequencing* (SCS) è una tecnica che esamina le informazioni sulle sequenze di singole cellule con tecnologie di sequenziamento di nuova generazione (*NGS*). Il processo dell'amplificazione del genoma³, processo essenziale per la SCS, introduce una serie di tipi di rumore, che risulta in inferenze sbagliate sui genotipi. Gli errori comprendono: errori di perdita allelica (ADO), errori di falsi positivi (FPs) e regioni di scarsa copertura. ADO in

²Metodo di classificazione degli esseri viventi che si basa sul grado di parentela, ovvero sulla distanza nel tempo dell'ultimo progenitore comune

³WGA: whole-genome amplification

particolare è un errore frequente nei dati SCS e contribuisce ad un numero considerevole di falsi negativi (FNs) nei dati. Gli algoritmi che verranno introdotti nel Capitolo 2 ed il lavoro di questa relazione introdotto nel Capitolo 3 cercano di mitigare questi problemi assumendo che questi errori avvengano uniformemente su tutti i valori della matrice in input, che rappresenta un modello di sostituzione analogo alla Figura 1.7.

1.5 Richiami di ottimizzazione matematica

In questa sezione verranno trattate inizialmente nozioni base di ottimizzazione matematica, in particolare sulla ricerca locale dell'ottimo, per poi introdurre due tecniche di ottimizzazione che verranno utilizzate nel Capitolo 2.

1.5.1 Hill climbing

In matematica, *hill climbing* è un algoritmo di ricerca dell'ottimo, migliorando la soluzione ripetutamente fino a quando non si raggiunge un criterio di ottimalità. L'idea è quella di partire da una soluzione sub-ottimale, che per analogia viene paragonato al partire alla base della collina, per poi migliorare la soluzione ottimale, che viene comparato allo scalare la collina, fino al raggiungimento di una condizione, cioè raggiungere la cima della collina. In maniera generale, si può modellare nella forma descritta in Algoritmo 1.

Algoritmo 1: Hill Climbing

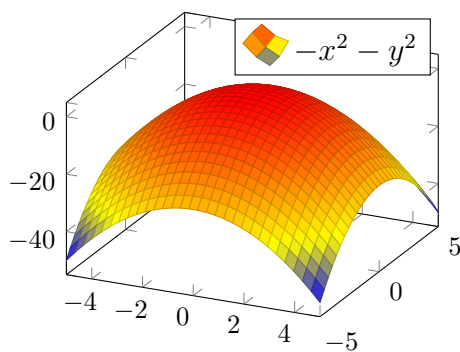
```
1  inizializzazione
2  while non raggiunta condizione di ottimalità do
3      seleziona e applica nuova operazione
4      if nuovo stato è ottimo then
5          | termina
6      end
7      if nuovo stato è migliore del precedente then
8          | stato = nuovo stato
9      end
10 end
```

Esistono numerose variazioni di questo algoritmo, ma le più conosciute sono *simple hill climbing*, *steepest hill climbing* e *stochastic hill climbing*, applicate a seconda delle proprietà del problema in questione. Un esempio di funzione da ottimizzare, in questo caso massimizzare, può essere come quella rappresentata in Figura 1.8a, dove esiste un solo ottimo locale ($f(x, y) = 0$) cioè la funzione è monomodale⁴. In questo caso, il *simple hill climbing* e lo *steepest hill climbing* ottengono sempre il risultato migliore.

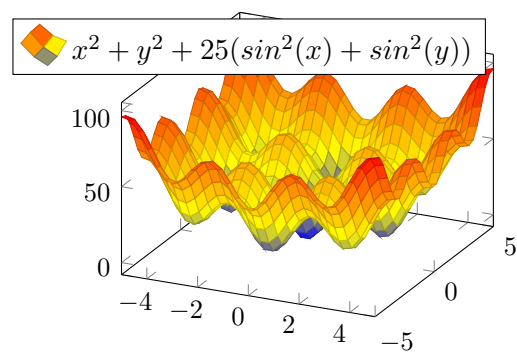
D'altro canto, funzioni plurimodali⁵ come "Eggrate" rappresentato in Figura 1.8b, dove le tecniche citate precedentemente falliscono miseramente. Entrano quindi in gioco algoritmi di ricerca locale che ammettono, con un certo grado di libertà, di accettare un risultato peggiore di quello attuale, nella speranza di non rimanere intrappolati in un ottimo locale.

⁴Una funzione monomodale è una funzione con un solo ottimo locale, che corrisponde anche all'ottimo globale della funzione stessa

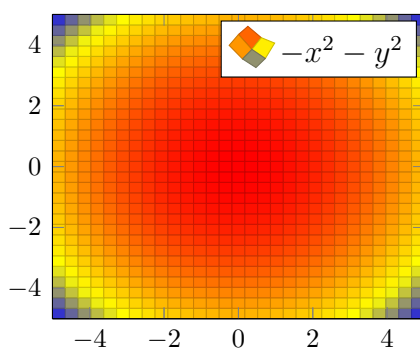
⁵Una funzione plurimodale è una funzione con più di un ottimo locale. Non è detto che esista un unico ottimo globale



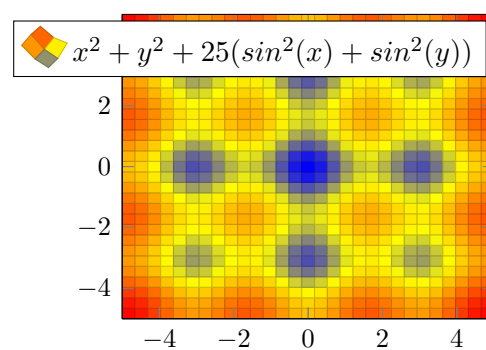
(a) Paraboloide, monomodale



(b) “Eggcrate”, plurimodale



(c) Paraboloide, monomodale



(d) “Eggcrate”, plurimodale

Figura 1.8: Esempi di funzione monomodale e plurimodale

1.5.2 Simulated Annealing

Per cambiare e migliorare delle caratteristiche di un solido, in metallurgia viene utilizzata la tecnica della *ricottura* (in inglese “anneal”), dove i solidi come l’acciaio, bronzo o alluminio, vengono portati ad altissime temperature, per essere poi raffreddati ad una certa velocità chiamata *cooling rate*, che determina le caratteristiche finali del metallo. Alle alte temperature, gli atomi si muovono molto velocemente e rompono le strutture cristalline che avevano formato precedentemente. Mano a mano che la temperatura cala, gli atomi rallentano, e si ricristallizzano.

Analogamente, la tecnica matematica del *simulated annealing* è un algoritmo di ricerca che utilizza la temperatura per riuscire a scappare da eventuali ottimi locali. Quando la temperatura è alta, l’algoritmo è meno propenso ad accettare nuovi soluzioni, anche se migliori. Mano a mano che la temperatura diminuisce, la probabilità che si accetti una soluzione migliore aumenta, fino al raggiungimento della condizione di ottimalità, cioè quando la temperatura non può più scendere, ed il risultato non può che essere un ottimo locale.

Questa funzione però molto spesso fallisce, specie se si cerca di ottimizzare una funzione plurimodale come in Figura 1.8b.

1.5.3 Particle Swarm Optimization

Un’altra tecnica di ricerca dell’ottimo è quella del *particle swarm optimization*. Questo algoritmo iterativo nasce inizialmente come simulazione del comportamento sociale di stormi di uccelli che si sincronizzano in volo, o un branco di pesci alla ricerca di cibo [4]: membri individuali del branco possono trarre vantaggio dalle scoperte ed esperienze

Algoritmo 2: Simulated Annealing

```

1  $best \leftarrow random()$ 
2  $T \leftarrow 1.0$ 
3  $T_{min} \leftarrow 0.0001$ 
4  $cooling\_rate \leftarrow 0.9$ 
5 while  $T > T_{min}$  do
6    $new\_best = neighbour(best)$ 
7    $ap \leftarrow acceptance\_probability(best, new\_best, T)$ 
8   if  $ap > random()$  then
9      $best \leftarrow new\_best$ 
10   $T = T * cooling\_rate$ 

```

passate di tutti gli altri membri durante la ricerca del cibo, un vantaggio che può rivelarsi decisivo per superare la competizione. Questa è un'ipotesi fondamentale per poter definire il *particle swarm optimization*.

Nell'algoritmo, il branco di pesci viene sfruttato come analogia per lo *swarm* (rappresentato in Figura 1.9), che indica l'insieme degli elementi appartenenti ad una popolazione, questi indicati come *particelle* dello swarm.

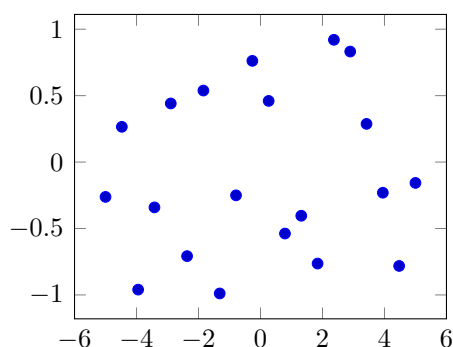
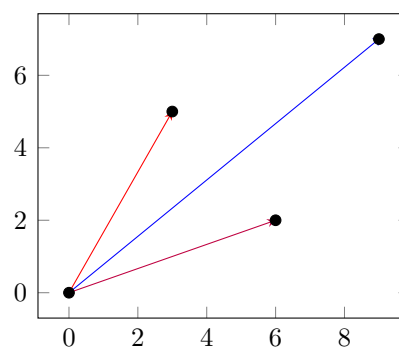


Figura 1.9: Esempio di swarm

Figura 1.10: Somma vettoriale tra p_i e g

Ad ogni iterazione, la posizione di ogni particella viene aggiornata per ogni dimensione del problema, basandosi sulla migliore posizione della particella p_i e sulla migliore posizione globale dello swarm g (in Figura 1.10 si vede un esempio di questa combinazione, dove la posizione finale del vettore è data dalla combinazione di due valori). Questa combinazione dei due valori migliori risolve il problema di rimanere intrappolati in un ottimo locale che presentano gli algoritmi visti nella sottosezione 1.5.1. Con il proseguire dell'algoritmo sarà possibile osservare che le singole particelle mano a mano convergono verso un ottimo locale, o di più, se la funzione da ottimizzare è multimodale (come in Figura 1.8b). È possibile inoltre introdurre la *velocità* come parte dell'algoritmo, al fine di influire su quanto velocemente una particella si muove verso la soluzione, che in algebra vettoriale si traduce nella modifica del modulo del vettore di spostamento.

Algoritmo 3: Particle Swarm Optimization

```
1  $n$  = numero particelle
2  $m$  = numero dimensioni dello spazio di ricerca
3 for  $i \leftarrow 1$  to  $n$  do
4    $x_i \sim U(b_{low}, b_{up}) \triangleright$  Inizializzo ogni particella con un valore random
    nel mio spazio di ricerca, delimitato da un lower bound  $b_{low}$  ed
    un  $b_{up}$ 
5    $p_i \leftarrow x_i \triangleright$  Inizializzo la posizione migliore della particella alla
    sua posizione iniziale
6   if  $f(p_i) > f(g)$  then
7      $g \leftarrow p_i \triangleright$  Aggiorno la posizione migliore globale
8    $v_i \sim U(-|b_{up} - b_{low}|, |b_{up} - b_{low}|) \triangleright$  Inizializzo la velocità iniziale
    della particella
9 while criterio di terminazione non soddisfatto do
10   for  $i \leftarrow 1$  to  $n$  do
11     for  $d \leftarrow 1$  to  $m$  do
12        $r_p, r_g \sim U(0, 1) \triangleright$  Parametri di casualità
13        $v_{i,d} \leftarrow \omega v_{i,d} + \phi_p r_p (p_{i,d} - x_{i,d}) + \phi_g r_g (g_d - x_{i,d}) \triangleright$  Aggiorno la
        velocità della particella
14        $x_i \leftarrow x_i + v_i \triangleright$  Aggiorno la posizione della particella
15       if  $f(x_i) > f(p_i)$  then
16          $p_i \leftarrow x_i \triangleright$  Aggiorno la posizione migliore della particella
17         if  $f(p_i) > f(g)$  then
18            $g \leftarrow p_i \triangleright$  Aggiorno la posizione migliore dello swarm
```

Capitolo 2

Stato dell'arte

2.1 Introduzione

Con l'avvento delle tecnologie per il sequenziamento del DNA partendo da singole cellule (SCS), iniziano ad essere disponibili dati di alta qualità. Queste tecnologie forniscono il sequenziamento di dati da singole cellule, permettendo quindi di ricostruire l'albero filogenetico di una cellula. È però da tenere in considerazione l'alto tasso di errore associato a questo tipo di dati, innalzando di conseguenza il grado di difficoltà del processo di ricostruzione della filogenesi. In questo capitolo, analizzeremo le tecnologie già presenti che hanno affrontato questa sfida.

2.2 SiFit: inferring tumor trees from single-cell sequencing data under finite-sites models

Il progetto *SiFit* nasce dall'esigenza di riuscire a risolvere il problema di trovare un albero filogenetico che rappresenti dati provenienti da SCS sottosezione 1.4.1, e sfrutta

2.2.1 L'algoritmo

SiFit sfrutta un approccio di tipo euristico per poter trovare un albero $\mathcal{T} = (T, t)$, dove T è la topologia dell'albero e t la lunghezza dei rami.

2.3 SciTe

2.4 SASC - Inferring Cancer Progression from Single-Cell Sequencing while Allowing Mutation Losses [\[2\]](#)

Capitolo 3

Inferenza di Alberi Tumoriali tramite Particle Swarm Optimization

3.0.1

Bibliografia

- [1] *Cancer Statistics*. URL: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>.
- [2] Simone Ciccolella et al. «Inferring Cancer Progression from Single-cell Sequencing while Allowing Mutation Losses». In: *bioRxiv* (2018). DOI: [10.1101/268243](https://doi.org/10.1101/268243).
- [3] Cooper GM. *The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition - DNA Replication*. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9940/>.
- [4] J. Kennedy e R. Eberhart. «Particle swarm optimization». In: vol. 4. Nov. 1995, 1942–1948 vol.4. DOI: [10.1109/ICNN.1995.488968](https://doi.org/10.1109/ICNN.1995.488968).
- [5] Max Roser e Hannah Ritchie. *OurWorldInData - Cancer*. Lug. 2015. URL: <https://ourworldindata.org/cancer>.
- [6] Giorgio Stanta e Serena Bonin. «Overview on Clinical Relevance of Intra-Tumor Heterogeneity». In: *Frontiers in Medicine* 5 (2018), p. 85. ISSN: 2296-858X. DOI: [10.3389/fmed.2018.00085](https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00085).