



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	13
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	15
1.6	Nozioni Extra	16
1.6.1	Catena di Markov	16
1.6.2	Likelihood	18
1.6.3	Matching	19
2	Stato dell'arte	21
2.1	Introduzione	21
2.2	SciTe [6]	21
2.2.1	Complessità	21
2.3	SiFit: inferring tumor trees from single-cell sequencing data under finite-sites models [12]	22
2.3.1	Complessità	22
2.4	SASC - Inferring Cancer Progression from Single-Cell Sequencing while Allowing Mutation Losses [2]	22
2.4.1	Complessità	23
3	Inferenza di Alberi Tumorali tramite Particle Swarm Optimization	25
3.1	Strumenti Utilizzati	25
3.2	Adattamento del problema a Particle Swarm Optimization	26
3.2.1	Inizializzazione	26
3.2.2	Calcolo del movimento della particella	26
3.3	Modello degli errori single-cell	27
3.4	Considerazioni aggiuntive	28
3.4.1	Riproducibilità	28
3.4.2	Guida allo strumento nello stato attuale	29
3.4.3	Parallelizzazione	29

3.5	Risultati e conclusioni	29
3.6	Prospettive future	29

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 [10]. 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 [10], 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

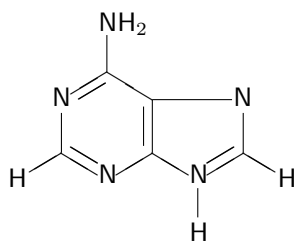
dal cibo, convertono quelle sostanze nutritive in energia, ed hanno delle funzioni specifiche. Le cellule contengono anche il materiale ereditario del corpo, e possono fare copie di loro stesse. Esse sono a loro volta costituite da diverse parti, tra le quali analizzeremo il nucleo e ciò che esso contiene,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

1.3.2 Il DNA

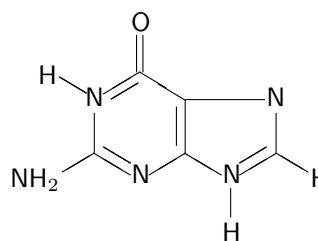
Il *DNA*, o *acido desossiribonucleico*, è il materiale ereditario degli organismi viventi presente in ogni cellula. La maggior parte del DNA è situato all'interno del nucleo della cellula (dove è chiamato *DNA cellulare*), ma può trovarsi anche all'interno dei mitocondri, organelli addetti alla respirazione 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.



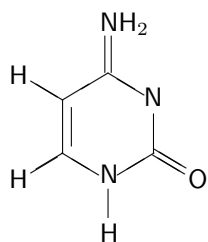
Figura 1.2: Il DNA



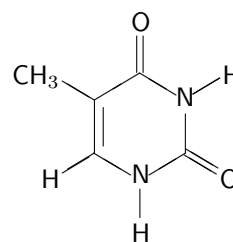
(a) Adenina (A)



(b) Guanina (G)



(c) Citosina (C)



(d) Timina (T)

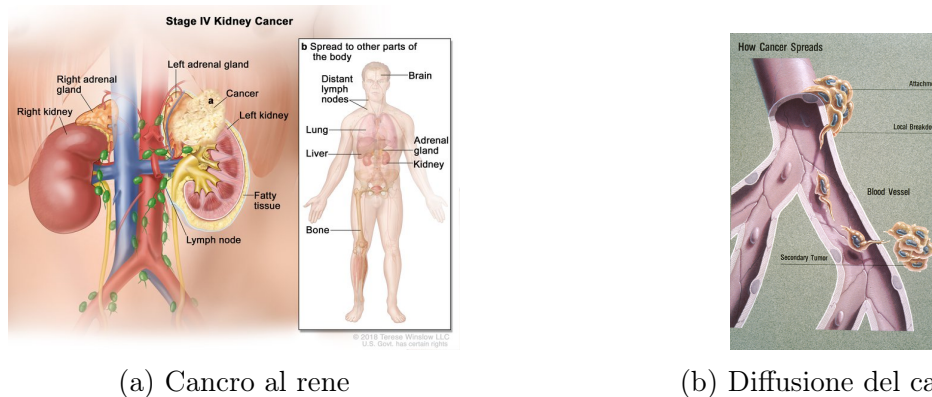
Figura 1.3: Basi azotate

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 [4] 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 [11].

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	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	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	
0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	
0	0	0	0	0	1	0	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	1	0	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	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	
0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	
1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	

Figura 1.7: Dataset di cellule tumorali e delle relative mutazioni

1.4.0.1 Tipi di modello di sostituzione

In biologia, al fine di poter spiegare le mutazioni che avvengono nel corso della vita di una cellula, si possono utilizzare due tipi di modello di sostituzione:

- modello a *finite-sites*
esiste un numero finito di posizioni dove può avvenire una mutazione, ergo se un carattere è 0 ad un tempo t , può darsi che non è avvenuta nessuna mutazione,

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

oppure che c'è stata una mutazione da 1 a 0, oppure che c'è stata una mutazione da 0, poi 1 ed infine a 0, e così via

- modello a *infinite-sites*
esiste un numero infinito di posizioni dove può avvenire una mutazione, di conseguenza ogni mutazione deve avvenire *per forza* in una nuova posizione rispetto alle precedenti

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 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

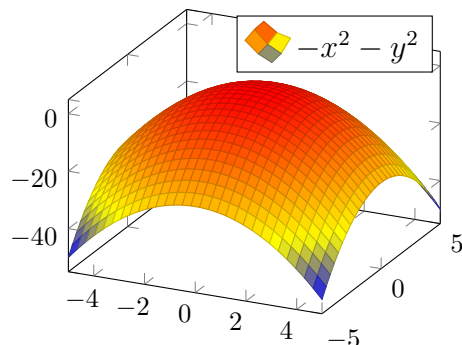
In matematica, *hill climbing* è un algoritmo di ricerca dell'ottimo, migliorando la soluzione ripetutamente fino a quando non si raggiunge un criterio di ottimalità. L'idea è quella di partire da una soluzione sub-ottimale, che per analogia viene paragonato al partire alla base della collina, per poi 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

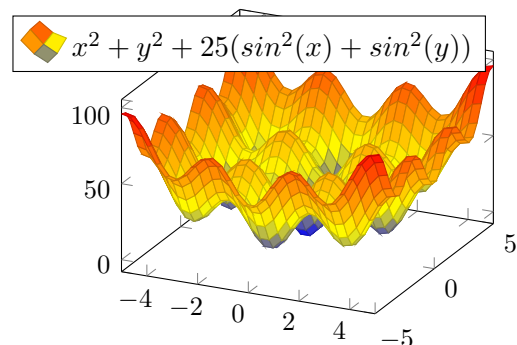
```
1  inizializzazione
2  while non raggiunta condizione di ottimalità do
3      seleziona e applica nuova operazione
4      if nuovo stato è ottimo then
5          termina
6      end
7      if nuovo stato è migliore del precedente then
8          stato = nuovo stato
9      end
10 end
```

³WGA: whole-genome amplification

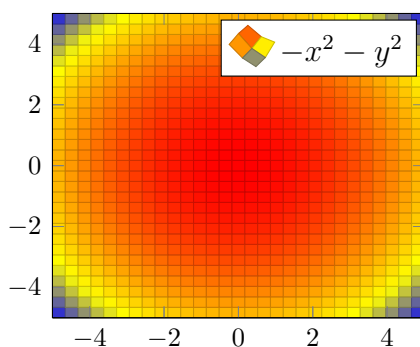
Esistono numerose variazioni di questo algoritmo, ma le più conosciute sono *simple hill climbing*, *steepest hill climbing* e *stochastic hill climbing*, applicate a seconda delle proprietà del problema in questione. Un esempio di funzione da ottimizzare, in questo caso massimizzare, può essere come 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.



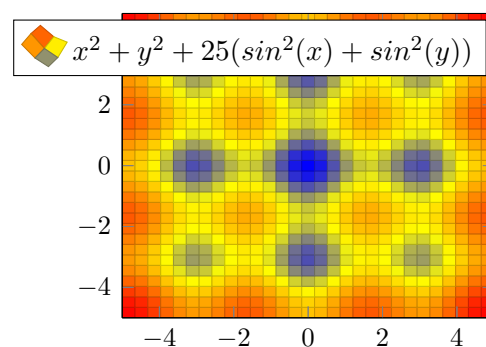
(a) Paraboloide, monomodale



(b) "Eggcrate", plurimodale



(c) Paraboloide, monomodale



(d) "Eggcrate", plurimodale

Figura 1.8: Esempi di funzione monomodale e plurimodale

D'altro canto, funzioni plurimodali⁵ come "Eggcrate" 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.

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.

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.

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 nuove 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.

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   $T = T * cooling\_rate$ 

```

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 [7]: membri individuali del branco possono trarre vantaggio dalle scoperte ed esperienze 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.

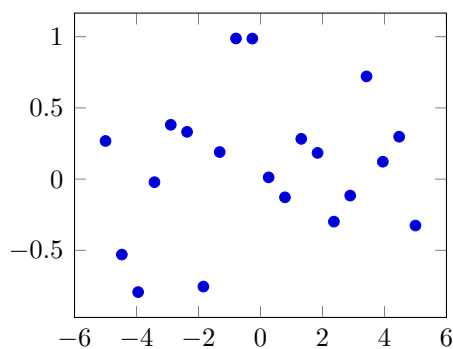


Figura 1.9: Esempio di swarm

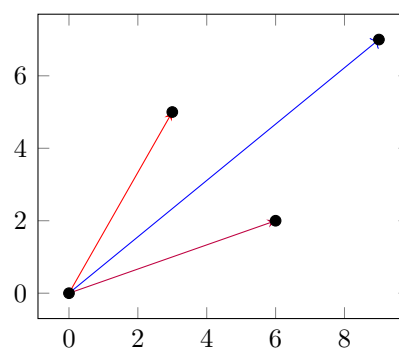


Figura 1.10: Somma vettoriale tra p_i e g

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

```

1.6 Nozioni Extra

In questa sezione verranno introdotti dei concetti aggiuntivi che non rientrano nelle sezioni sopracitate, e le cui basi si assumono essere già presenti per la comprensione degli stessi. Queste nozioni verranno utilizzate nei capitoli successivi per complementare la spiegazione di modelli, termini o algoritmi.

1.6.1 Catena di Markov

In teoria probabilistica, una *Catena di Markov* è un modello stocastico che descrive una sequenza di possibili eventi la cui probabilità dei singoli eventi dipende solo ed unicamente

dallo stato dell'evento che lo precede. Questa definizione si traduce nell'assunzione che gli stati passati e futuri di ogni evento sono indipendenti rispetto alla storia di tutti gli eventi già avvenuti all'interno della catena.

Il modello è strutturato come una *macchina a stati finiti*, dove i rami che collegano uno stato ad un altro hanno un valore numero associato, chiamato la *probabilità di transizione*, che indica quanto è probabile passare allo stato di destinazione.

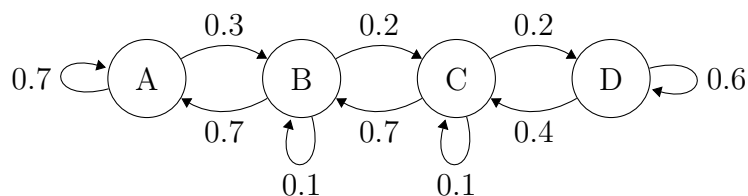


Figura 1.11: Esempio di catena di Markov

Una catena di Markov può essere vista anche come una sequenza di variabili aleatorie X_0, X_1, X_2, \dots che soddisfano la proprietà di indipendenza. Questa soddisfacibilità è definita come *Proprietà di Markov*:

$$P(X_n = i_n | X_{n-1} = i_{n-1}) = P(X_n = i_n | X_0 = i_0, X_1 = i_1, \dots, X_{n-1} = i_{n-1}) \quad (1.1)$$

Le probabilità di transizione in un dato tempo t per ogni stato della catena possono essere rappresentate come una matrice P_t , denominata *matrice di transizione* e definita come segue:

$$(P_t)_{i,j} = \mathbb{P}(X_{t+1} = j | X_t = i) \quad (1.2)$$

Questo significa che ogni riga della matrice è un *vettore di probabilità*, e la somma dei suoi elementi è sempre 1.

Una matrice di transizione $P_t^{(k)} = P_t \cdot P_{t+1} \cdots P_{t+k-1}$ soddisfa quindi:

$$P_t^{(k)} = \begin{pmatrix} \mathbb{P}(X_{t+k} = 1 | X_t = 1) & \mathbb{P}(X_{t+k} = 2 | X_t = 1) & \dots & \mathbb{P}(X_{t+k} = n | X_t = 1) \\ \mathbb{P}(X_{t+k} = 1 | X_t = 2) & \mathbb{P}(X_{t+k} = 2 | X_t = 2) & \dots & \mathbb{P}(X_{t+k} = n | X_t = 2) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \mathbb{P}(X_{t+k} = 1 | X_t = n) & \mathbb{P}(X_{t+k} = 2 | X_t = n) & \dots & \mathbb{P}(X_{t+k} = n | X_t = n) \end{pmatrix}. \quad (1.3)$$

Nell'esempio in Figura 1.11 la matrice di transizione a $k = 0$ è come segue:

$$P_t^0 = \begin{pmatrix} 0.7 & 0.3 & 0 & 0 \\ 0.7 & 0.1 & 0.2 & 0 \\ 0 & 0.7 & 0.1 & 0.2 \\ 0 & 0 & 0.4 & 0.6 \end{pmatrix} \quad (1.4)$$

1.6.1.1 Catena di Markov: Variante Monte Carlo (MCMC)

Il metodo *Monte Carlo* in statistica si basa sul campionamento casuale per ottenere dei risultati. Un esempio del loro utilizzo è dato dal calcolo dell'area di una funzione complessa: vengono generati n punti casuali, e si calcola quanti di questi rientrano all'interno della funzione della quale vogliamo calcolare l'area. Il numero di questi punti che ricade

in questa categoria ci fornisce un grado di approssimazione proporzionale al numero di punti che generiamo per ottenere il risultato finale: più punti generiamo, più è accurata la stima dell'area, o più in generale, di qualunque cosa stiamo cercando di approssimare.

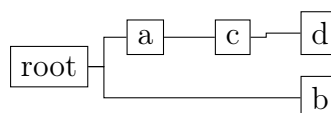
Volendo ad esempio stimare una distribuzione a posteriori⁶ è possibile utilizzare una variante della Catena di Markov sfruttando le proprietà aleatorie del metodo Monte Carlo: la tecnica così ottenuta è definita una *Monte Carlo Markov Chain* (MCMC). Ogni valore generato è aleatorio, ma le scelte fatte per generare i valori successivi sono limitate dallo stato corrente e dalla distribuzione dei valori attuali. Una MCMC quindi può essere paragonata ad un cammino aleatorio⁷ che con l'aumentare delle iterazioni converge alla distribuzione (o modello matematico) che si vuole stimare.

1.6.2 Likelihood

Uno dei problemi della genomica (ma anche di altri campi, come la linguistica [5]) è quello di ricostruire un albero filogenetico partendo da dati raccolti di caratteri appartenenti una popolazione. I dati in questione seguono il modello di sostituzione (sezione 1.4) ed i tratti possono essere qualunque aspetto della popolazione, come altezza, peso, capacità di volare o di respirare sott'acqua. Nel presente lavoro, la popolazione presa in analisi sono cellule, ed i tratti considerati sono le mutazioni acquisite, ed il problema si può interpretare come la ricerca del migliore albero filogenetico che meglio rappresenta il modello di sostituzione. Per stabilire come un albero è *migliore* di un altro, viene definita una funzione di *likelihood*, che esprime appunto quanto è probabile un particolare set di parametri statistici (nel nostro caso la configurazione dei nodi dell'albero inferito) data il modello di sostituzione iniziale. Supponendo di aver generato un albero T con n nodi, un nodo per ogni mutazione, e ad ogni foglia può essere associata una cellula. Le cellule così assegnate avranno una serie di caratteri, che vengono acquisiti o persi una volta per ogni nodo padre.

a	b	c	d
1	0	0	0
0	1	0	0
1	0	1	0
1	0	1	1

(a) Modello di sostituzione



(b) Esempio di albero inferito

Figura 1.12

Il calcolo della likelihood \mathcal{L} si basa sulla probabilità condizionata della configurazione attuale dell'albero T dato il modello di sostituzione in input M , con n righe (una per ogni cellula) e m colonne (una per ogni mutazione), che si traduce in termini generali nella formula che segue:

$$\mathcal{L}(T) = \mathcal{L}(1) \cdot \mathcal{L}(2) \cdots \mathcal{L}(n) = P(M|T) = \prod_{j=1}^m P(M_j|T) \quad (1.5)$$

⁶Distribuzione di una variabile aleatoria condizionata a delle informazioni rilevanti su di essa

⁷Modello matematico che descrive un processo stocastico come una successione di step aleatori all'interno di uno spazio matematico (e.g. \mathbb{Z})

Spesso è utile riportare la somma logaritmica delle likelihood ad ogni posizione, poiché le probabilità condizionate di ogni nodo si traducono in numeri molto piccoli. La formula per il calcolo della *logaritmica likelihood* si traduce quindi come segue:

$$\ln \mathcal{L} = \ln \mathcal{L}(1) + \ln \mathcal{L}(2) + \ln \mathcal{L}(n) = \sum_{j=1}^m \ln \mathcal{L}(j) \quad (1.6)$$

1.6.3 Matching

Nella teoria dei grafi un *matching* M è definito come un sottoinsieme di coppie di nodi di un grafo $G = (V, E)$ tale per cui ogni coppia non è adiacente ad un'altra, e nessuna coppia è un loop; ciò significa che nessuna coppia condivide un nodo.

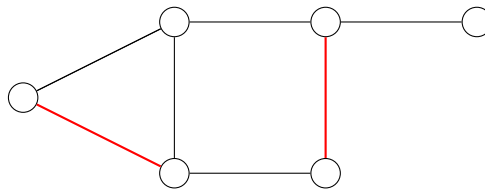


Figura 1.13: Esempio di matching

1.6.3.1 Maximum Weight Matching

Dato un grafo pesato $G = (V, E, w)$, con $w : E \rightarrow \mathbb{R}$, il *maximum weight matching* è un matching per cui la somma:

$$\sum_e^E w(e) \quad (1.7)$$

È massima.

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, verranno esaminate le tecnologie già presenti che hanno affrontato questa sfida, focalizzando l'analisi sul modello di ricerca dell'ottimo, del calcolo della *likelihood* dell'albero inferito e della complessità dell'algoritmo utilizzato.

2.2 SciTe [6]

SCITE (*Single-Cell Inference of Tumor Evolution*) usa un approccio basato sulla likelihood dell'albero inferito per fare una ricerca stocastica dell'albero migliore rispetto ai dati in input. Ricordando l'assunzione che le mutazioni siano indipendenti l'una dall'altra, dati i tassi di errore $\theta = (\alpha, \beta)$, la matrice M di partenza di dimensioni $n \times m$, dove n è il numero di cellule e m il numero di mutazioni, possiamo calcolare la likelihood come segue:

$$P(M|T, \sigma, \theta) = \prod_{i=1}^n \prod_{j=1}^m P(M_{i,j}|D_{i,j}) \quad (2.1)$$

Lo strumento è costruito attorno al funzionamento di una catena di Markov Monte Carlo (sottosottosezione 1.6.1.1) che permette di trovare l'albero migliore basandosi sulla likelihood calcolata, oppure basandosi sulla distribuzione a posteriori. Uno dei principali vantaggi indicati è quello della scalabilità lineare, proporzionale con il numero dei campioni.

2.2.1 Complessità

Ad ogni step, la MCMC impiega $O(mn)$ per calcolare la likelihood dell'albero, impiegando un tempos stimato di $O(mn^3 \ln(n))$ per una convergenza all'albero migliore. Il tempo è linearmente dipendente con il numero dei campioni e di mutazioni.

2.3 SiFit: inferring tumor trees from single-cell sequencing data under finite-sites models [12]

Il progetto *SiFit* affronta il problema presupponendo un modello a posizioni finite (*finite sites model*), quindi permettendo delle back-mutation¹. Lo strumento accetta sia matrici binarie, con un set di valori possibili $\{0, 1, X\}$, che matrici ternarie, per le quali accetta il set di valori $\{0, 1, 2, X\}$, dove 0 denota un genotipo *reference* omozigota, 1 e 2 denotano un genotipo eterozigota ed omozigota *non-reference*, rispettivamente, e X denota la mancanza di informazioni.

Vengono principalmente usati due tipi di mosse: mosse di *prune and regraft* e mosse di *swap*. Le mosse di *prune and regraft* prevedono il cambiamento randomico della topologia dell'albero attraverso il riposizionamento di un sottoalbero all'interno (rSPR, *random Subtree Prune and Regraft*) e la lunghezza dei rami dell'albero (eSPR, *extending Subtree Pruning and Regrafting*). Le mosse di *swap* prevedono lo scambio di nodi interni all'albero (stNNI, *stochastic nearest-neighbour interchange*) e dei rami (rSTS, *random Sub-Tree Swapping*) [12, 8].

2.3.1 Complessità

Ad ogni passo dell'algoritmo proposto, calcolare la *likelihood* dell'albero è il processo più dispendioso. Per n singole cellule e m mutazioni, il calcolo della likelihood impiega $\mathcal{O}(nk^2m)$, dove k è il numero massimo di stati per mutazione, quindi $k = 3$ e $k = 2$ per una matrice ternaria e una matrice binaria in input, rispettivamente.

Il numero di iterazioni i è definito dall'utente, ottenendo quindi come complessità generale dell'algoritmo $\mathcal{O}(nk^2mi)$.

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

In SASC (*Simulated Annealing Single-Cell inference*) viene utilizzato il modello *finite-sites* insieme al modello di Dollo- k . Il modello della Parsimonia di Dollo prevede che ogni mutazione può essere acquisita una sola volta, ma una perdita di una mutazione può accadere un numero indefinito di volte. La versione ristretta di Dollo- k assume che ogni mutazione possa essere acquisita una sola volta e persa al massimo k volte. Per trovare l'albero migliore il problema viene modellato sull'algoritmo euristico *simulated annealing* (sottosezione 1.5.2). Le mosse utili alla scalata della collina sono: *aggiunta di back-mutation*, *rimozione di back-mutation*, *node switch* e *prune-and-regraft*.

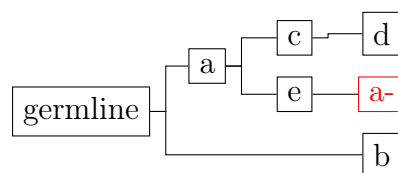


Figura 2.1: Esempio di back-mutation

¹Mutazioni all'indietro, una mutazione viene persa durante la vita di una cellula

Ad ogni riduzione della temperatura viene cercato un albero topologicamente vicino a quello attuale applicando una delle quattro operazioni precedenti, finché non si raggiunge la temperatura minima. La bontà dell'albero è definita dalla *likelihood logaritmica*, e viene calcolata ad ogni operazione effettuata sull'albero inferito nella seguente maniera:

$$\max \sum_i^n \sum_j^m \log(P(M_{i,j}|D_{i,j})) \quad (2.2)$$

2.4.1 Complessità

L'algoritmo Simulated Annealing impiega $O(\log t)$ step fino a quando non raggiunge la temperatura minima, con t ad indicare la temperatura di partenza, e per ogni step impiega $O(nm)$ per calcolare la likelihood logaritmica. In generale, SASC ha una complessità di $O(nm \log t)$.

Capitolo 3

Inferenza di Alberi Tumoriali tramite Particle Swarm Optimization

In questa sezione verrà descritto lo strumento di inferenza di alberi tumoriali tramite Particle Swarm Optimization (d'ora in poi **PSO**), le ipotesi effettuate, i risultati ottenuti ed eventuali conclusioni. Viene utilizzata la tecnica euristica Particle Swarm Optimization, descritta precedentemente nel sottosezione 1.5.3.

3.1 Strumenti Utilizzati

Lo strumento è stato sviluppato in Python. Inizialmente si era cercato di utilizzare Cython¹, poi abbandonato poiché lo studio di questo linguaggio di programmazione avrebbe ridotto il tempo utile alla vera e propria implementazione dello strumento. Si pensa però in futuro di riscrivere il codice utilizzando *C++*.

L'ambiente di sviluppo scelto è *Visual Studio Code*, con l'ausilio delle estensioni di debugging per Python. In generale sono sempre stati utilizzati strumenti che seguono la filosofia *Open Source*, di conseguenza questa tesi ed il codice sviluppato saranno entrambi disponibili liberamente sul profilo GitHub [3] del sottoscritto sotto licenza GPL3 e MIT rispettivamente.

I moduli e le librerie Python che sono state utilizzate sono elencate di seguito:

- [random](#) – modulo standard che implementa funzioni per la generazione di numeri pseudo-randomici
- [multiprocessing](#) – modulo standard utilizzato per implementare il supporto di parallelizzazione e gestione della concorrenza
- [sys](#) – modulo standard per accedere ad alcune variabili o funzioni di sistema
- [time](#) – modulo standard usato per accedere a funzioni relative al tempo, come l'accesso all'ora attuale, o per la misurazione dei tempi di esecuzione
- [math](#) – modulo standard che permette l'accesso a funzioni ottimizzate per il calcolo matematico
- [copy](#) – modulo standard utilizzato per copiare in profondità degli oggetti, con un nuovo puntatore all'oggetto

¹Un linguaggio di programmazione simile a Python, ma con il vantaggio di avere velocità simili a quelle ottenute da C

- * [graphviz](#) – modulo esterno per la visualizzazione ed il salvataggio su file dei grafi da formato graphviz²
 - * [ete3](#) – modulo esterno utilizzato come base di appoggio per le funzioni essenziali relative ai nodi di un albero, come la ricerca dei nodi e l'aggiunta o rimozione di essi
 - * [networkx](#) – modulo esterno sfruttato per il calcolo del *maximum weight matching*
- * Moduli esterni

3.2 Adattamento del problema a Particle Swarm Optimization

Una delle principali sfide in questo progetto è stata di riuscire a trovare un'interpretazione valida ed efficace adatta alla tecnica euristica scelta, appunto il Particle Swarm Optimization, il cui funzionamento ed algoritmo sono descritti dettagliatamente nella sottosezione 1.5.3. Possiamo quindi dividere l'implementazione in quattro fasi:

1. Inizializzazione
2. Calcolo del movimento della particella
3. Aggiornamento della particella
4. Aggiornamento della particella migliore dello swarm e della soluzione migliore della particella

3.2.1 Inizializzazione

Possiamo considerare una particella dello swarm come un albero, la cui posizione è determinata dalla configurazione dei suoi nodi. L'inizializzazione viene effettuata randomizzando la topologia di un albero binario T con m nodi, uno per ogni mutazione, con una funzione randomica³. In questo modo, viene ottenuta una topologia simile a quella rappresentata nella Figura 3.1. Il metodo di generazione dell'albero binario è ripreso da quello implementato su SASC, ed è descritto nell'Algoritmo 4.

3.2.2 Calcolo del movimento della particella

La seconda fase è il calcolo della velocità con la quale una particella si muove rispetto a p_i e g , cioè l'albero migliore che ha avuto la particella fino ad ora, e l'albero migliore in tutto lo swarm. Come parametro di paragone è definita la likelihood logaritmica descritta nell'Equazione 2.2.

Questo step è stato uno dei problemi principali da affrontare sin dal principio del progetto. Non è immediato trovare un modello diretto che rappresenti la velocità e la direzione di una particella verso gli alberi migliori p_i e g , data la natura non lineare del problema. Sono state, dunque, introdotte diverse metriche (o assenza di tali) per cercare di definire al meglio questo parametro in maniera tale che aderisse al meglio all'algoritmo scelto, quindi PSO. Nelle seguenti sottosezioni verranno descritti tali esperimenti, con risultati e considerazioni del caso.

²Strumento che permette di disegnare rappresentare dei grafi utilizzando la notazione DOT, un linguaggio che descrive la struttura di grafi generici

³In realtà la funzione è del tipo pseudo-randomica, utilizzando il generatore *Mersenne Twister* [9], ma non avendo problemi dal punto di vista della sicurezza o della riproducibilità, è stato pervenuto che per i nostri scopi è più che valido e sufficiente

Algoritmo 4: RandomTreeInit

```
1  $m$  = numero di mutazioni  $r$  = radice dell'albero
2  $tree = [1, \dots, m] \triangleright$  Vettore con tutti i nodi dell'albero
3 random.shuffle(tree)  $\triangleright$  Il vettore dei nodi viene randomizzato
4  $nodes \leftarrow [r]$ 
5  $append\_node \leftarrow 0$ 
6 while  $i < m$  do
7     newNode  $\leftarrow$  new Node(name = mutation_name( $m$ ), parent =
        nodes[append_node], mutationid = tree[i])
8     nodes.append(newNode)
9      $i \leftarrow i + 1$ 
10    if  $i < m$  then
11        newNode  $\leftarrow$  new Node(name = mutation_name( $m$ ), parent =
            nodes[append_node], mutationid = tree[i])
12        nodes.append(newNode)
13    append_node  $\leftarrow$  append_node + 1  $i \leftarrow i + 1$ 
14 return  $r$ 
```

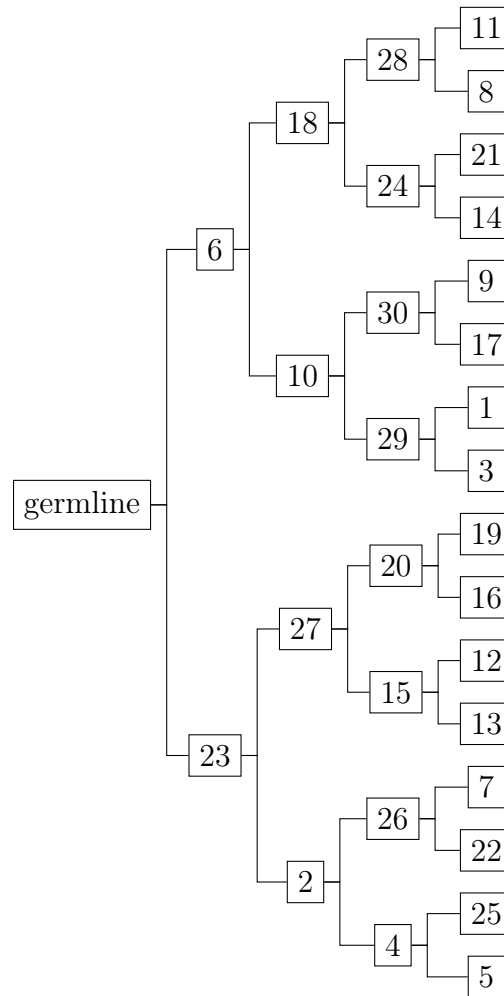
3.2.2.1 Assenza del parametro di velocità

Nei momenti iniziali di questo progetto, come è stato descritto precedentemente, trovare una corrispondenza congeniale ed adeguata all'idea di *velocità* del PSO è stato impegnativo. Al fine comunque di poter dare un via al lavoro, una delle prime metriche adottate di velocità è stata la vera e propria assenza di tale metrica. I risultati descritti nella ?? possono sembrare promettenti, dato che comunque provano la funzionalità del programma, e che la likelihood aumenta. Quello che i dati non ci dicono è però qualcosa che possiamo intuire dall'intrinseco comportamento dell'assenza della velocità come metrica: siamo di fronte ad un semplice algoritmo di highest hill climbing, descritto nella sottosezione 1.5.1. Quello che succede quindi è che si cerca di migliorare l'algoritmo al primo miglioramento individuato, in questo caso corrisponde ad ogni volta che si trova una likelihood migliore. Questo può sembrare un ottimo risultato, ma è in realtà un problema. L'estrema e ripida scalata rischia di incastrare la ricerca in un ottimo locale, peggiorando considerevolmente le possibilità di trovare un albero filogenetico di **buona qualità**. È importante sottolineare la *bontà* del risultato, e non il basso valore della *likelihood*, in quanto questo è solo un valore indicativo della verosomiglianza dell'albero con i dati a nostra disposizione, ma non dell'effettiva qualità della loro rappresentazione. È molto meglio quindi cercare di trovare un albero filogenetico con una qualità migliore che quello con la likelihood più elevata.

3.2.2.2

3.3 Modello degli errori single-cell

I dati single-cell vengono rappresentati tramite un modello di sostituzione come quello illustrato nella sezione 1.4 tramite una matrice $M = n \times m$, con n cellule e m mutazioni. Viene poi utilizzata una matrice $D = n \times m$ è ricavata dall'osservazione dell'albero inferito, ed è una versione imperfetta del vero genotipo della matrice M . Per mitigare i problemi causati dalle tecniche di WGA (sottosezione 1.4.1) viene utilizzato il parametro α per indicare la probabilità di incontrare un falso positivo, quindi osservare un 1 quando in realtà questo è uno 0, e falsi

Figura 3.1: Esempio di topologia iniziale con $m = 30$

negativi, cioè di avere la probabilità β di osservare uno 0 quando in realtà è un 1:

$$\begin{aligned} P(M_{i,j} = 0 | D_{i,j} = 0) &= 1 - \alpha, & P(M_{i,j} = 0 | D_{i,j} = 1) &= \beta, \\ P(M_{i,j} = 1 | D_{i,j} = 0) &= \alpha, & P(M_{i,j} = 1 | D_{i,j} = 1) &= 1 - \beta \end{aligned} \quad (3.1)$$

3.4 Considerazioni aggiuntive

Al fine di poter eseguire delle analisi e considerazioni sui risultati ottenuti sono stati fatti diversi accorgimenti sul progetto, di seguito analizzati.

3.4.1 Riproducibilità

Durante lo sviluppo di un software può capitare di dover rappresentare una situazione, come un bug, una feature, o un risultato particolare. Questa necessità dà luogo al problema della *riproducibilità*, che implica la possibilità allo sviluppatore o a terzi di poter eseguire il software con parametri comuni al fine di ottenere gli stessi risultati e situazioni. Questo obiettivo è stato raggiunto con diversi accorgimenti, come l'elevata flessibilità di configurazione da linea di comando (descritta in dettaglio nel sottosezione 3.4.2) e la possibilità di poter manipolare gli eventi aleatori fissando un *seed*⁴.

⁴Un numero, o vettore, utilizzato per inizializzare un generatore pseudo-casuale di numeri, come quello utilizzato dalla libreria *random* di Python

3.4.2 Guida allo strumento nello stato attuale

3.4.3 Parallelizzazione

3.5 Risultati e conclusioni

3.6 Prospettive future

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] *GitHub Profile - IAL32*. URL: <https://github.com/IAL32>.
- [4] Cooper GM. *The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition - DNA Replication*. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9940/>.
- [5] Gerhard Jäger. «Global-scale phylogenetic linguistic inference from lexical resources». In: *Scientific Data* 5 (ott. 2018), 180189 EP -. DOI: [10.1038/sdata.2018.189](https://doi.org/10.1038/sdata.2018.189).
- [6] Katharina Jahn, Jack Kuipers e Niko Beerenwinkel. «Tree inference for single-cell data». In: *Genome Biology* 17.1 (mag. 2016), p. 86. ISSN: 1474-760X. DOI: [10.1186/s13059-016-0936-x](https://doi.org/10.1186/s13059-016-0936-x).
- [7] 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).
- [8] Clemens Lakner et al. «Efficiency of Markov Chain Monte Carlo Tree Proposals in Bayesian Phylogenetics». In: *Systematic Biology* 57.1 (feb. 2008), pp. 86–103. ISSN: 1063-5157. DOI: [10.1080/10635150801886156](https://doi.org/10.1080/10635150801886156).
- [9] Makoto Matsumoto e Takuji Nishimura. «Mersenne Twister: A 623-dimensionally Equidistributed Uniform Pseudo-random Number Generator». In: *ACM Trans. Model. Comput. Simul.* 8.1 (gen. 1998), pp. 3–30. ISSN: 1049-3301. DOI: [10.1145/272991.272995](https://doi.org/10.1145/272991.272995).
- [10] Max Roser e Hannah Ritchie. *OurWorldInData - Cancer*. Lug. 2015. URL: <https://ourworldindata.org/cancer>.
- [11] 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).
- [12] Hamim Zafar et al. «SiFit: inferring tumor trees from single-cell sequencing data under finite-sites models». In: *Genome biology* 18.1 (2017), p. 178. DOI: [10.1186/s13059-017-1311-2](https://doi.org/10.1186/s13059-017-1311-2).