

Análisis y detección de correlaciones en relevamientos transcripcionales
de gran escala

Tesis de Licenciatura en Ciencias Físicas

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Universidad de Buenos Aires

Andrés Rabinovich

Marzo 2016

Hoja a completar por los jurados

Resumen

Abstract

Dedicatoria

Índice general

1. Métodos de agrupamiento de datos	11
1.1. Similaridad, distancia y disimilaridad	12
1.1.1. Medidas de distancia	13
1.1.2. Similaridad semántica	17
1.2. Estrategias de agrupamiento	20
1.3. Agrupamientos no jerárquicos	21
1.3.1. K-means	21
1.3.2. PAM	21
1.4. Agrupamientos jerárquicos	22
1.4.1. Método de Ward	23
1.4.2. Método de enlace único (o single-link en inglés)	23
1.4.3. Método de enlace completo (o complete-link en inglés)	24
1.4.4. Representación de un agrupamiento jerárquico - dendrogramas	24
1.5. Detectando grupos en el agrupamiento jerárquico	24
1.5.1. Corte de árbol estático	25
1.5.2. Corte de árbol dinámico híbrido	26
1.6. Infomap y CNM	28
2. conclusiones y perspectivas	30

Motivaciones y objetivos

La genómica funcional es un campo de la biología molecular que hace extenso uso de datos genómicos y transcriptómicos para estudiar, describir y responder preguntas acerca de la expresión, función e interacción de genes y proteínas en una escala global (a lo largo de todo el genoma), en contraposición con los métodos más tradicionales de estudio que se realizan gen por gen.

Desde principios del año 2000, a partir de la aparición de tecnologías experimentales modernas, tales como la tecnología de Micromatrices de ADN (DNA microarray), secuenciadores de nueva generación (NGS) o secuenciadores de ARN (RNAseq), es posible relevar el estado transcripcional de una célula de forma global, es decir, cuantificar los niveles de todo el RNA mensajero que está siendo exportado en un dado momento desde el núcleo celular hacia el citoplasma con el fin de producir determinadas proteínas. La realización de este tipo de estudios posee un potencial enorme, con aplicaciones tanto en áreas de investigación básica como aplicada, investigaciones biomédicas, farmacológicas y de la salud.

En particular, en relevamientos transcripcionales de gran escala es posible obtener información sobre el nivel de activación de miles de genes, para decenas o cientos de condiciones ambientales/experimentales diferentes. Para ganar conocimiento biológico a partir de la cantidad enorme de datos que estos relevamientos generan, es necesario implementar estrategias de búsqueda de correlaciones en espacios de alta dimensionalidad.

Para ello, es de fundamental importancia el estudio e implementación de procedimientos de búsqueda de estructuras aplicables a este tipo de relevamientos, cobrando predominancia técnicas estadísticas y técnicas de aprendizaje automático no supervisado, tales como las técnicas de agrupamiento o “clustering”, que permitan reconocer subconjuntos de genes que evidencien patrones de coexpresión similares a lo largo de conjuntos específicos de condiciones experimentales. [?, ?]

Objetivos y organización de la tesis

El presente trabajo tiene como objetivo analizar la coherencia entre la métrica transcripcional y la inferida a partir de otros espacios de conocimiento, como ser redes de

interacción de proteínas (PIN por sus siglas en ingles), redes inferidas de literatura curada (LCI), vías metabólicas (KEGG) y ontología genética (GO).

Vamos a haerlo cuantitativamente y tartar de incorporar lo encontrado en la elaboracion de metricas mixtas que permitan clusterear perfiles y obtener estructuras compactas (coherentes) en varios espacios. Para esto Vamos a usar dataset de wiegel (presentarlo someramente) y PIN y LCI del paper tal y GO de tal lugar Curado manual y de ontologia para ver que hay informacion biologica contenida en clustering por coexpresion

Esta tesis está organizada de la siguiente forma. En el capítulo 1 se introdujeron los conceptos biológicos necesarios para comprender y motivar los datos presentados y analizados. En el capítulo 2 introduciremos los materiales y métodos utilizados a lo largo del trabajo. Describiremos la composición y funcionamiento de los métodos de obtención de los cuatro tipos de datos que analizaremos (micromatrices de ADN, redes de interacción de proteínas, redes de vías metabólicas y ontología GO). En el capítulo 3 presentaremos en detalle los métodos de agrupamiento de datos utilizados en este trabajo y analizaremos las problemáticas asociadas a cada uno. En el capítulo 4 analizaremos los datos mediante los métodos presentados en el capítulo 3 y los caracterizaremos buscando información biológica en los mismos. En el capítulo 5 utilizaremos la información obtenida en el capítulo 4 para proponer una métrica mixta que permita aumentar la cantidad de información biológica obtenida previamente. Finalmente, en el último capítulo analizaremos los resultados obtenidos y plantearemos futuras líneas de estudio.

Capítulo 1

Introducción biológica

Este capítulo tiene por objetivo el introducir al lector en los conceptos biológicos básicos necesarios para comprender y motivar los datos presentados y analizados en este trabajo. El lector que desee profundizar sobre los mismos puede remitirse a [?, ?].

1.1. Información hereditaria: ADN

Las células y los organismos pueden ser divididos en dos ramas, procariotas (como las bacterias) y eucariotas (como las plantas, hongos y animales). En las procariotas, el material genético no ocupa una región definida dentro de la célula, sino que se encuentra dispersa en el citoplasma, mientras que en las eucariotas, el material genético se encuentra separado del citoplasma en una región denominada núcleo (figura ??).

Todas la células vivas de La Tierra transmiten su información genética hereditaria por medio del ADN (ácido desoxirribonucleico). El ADN es una molécula unidimensional formada por dos hebras enrolladas una alrededor de la otra en una estructura de doble hélice (figura: ??). Las hebras son cadenas largas de polímeros formadas por monómeros (los nucleótidos), que consisten en dos partes: una columna conformada por un azúcar (desoxirribosa) con un grupo fosfato adherido, y una base nitrogenada, que puede ser adenina (A), guanina (G), citosina (C) o timina (T). Cada azúcar se conecta al siguiente mediante un grupo fosfato, con una protuberancia formada por la base, creando de esta manera una cadena polimérica. En principio, es posible extender la cadena de ADN agregando cualquier monómero al final de la misma. Sin embargo, el ADN no se sintetiza como una única hebra, sino a partir de una hebra preexistente, por lo que cada nucleótido debe conectarse mediante puentes de hidrógeno con un nucleótido de la hebra preexistente siguiendo unas reglas estrictas definidas por la estructura complementaria de las bases: A se conecta con T (mediante dos puentes de hidrógeno) y C con G (mediante tres). De esta manera, se forma la estructura de doble hélice con hebras complementarias del ADN. Las uniones entre las bases son mucho más débiles que entre los azúcares y los grupos fosfato, lo que permite a las hebras separarse sin

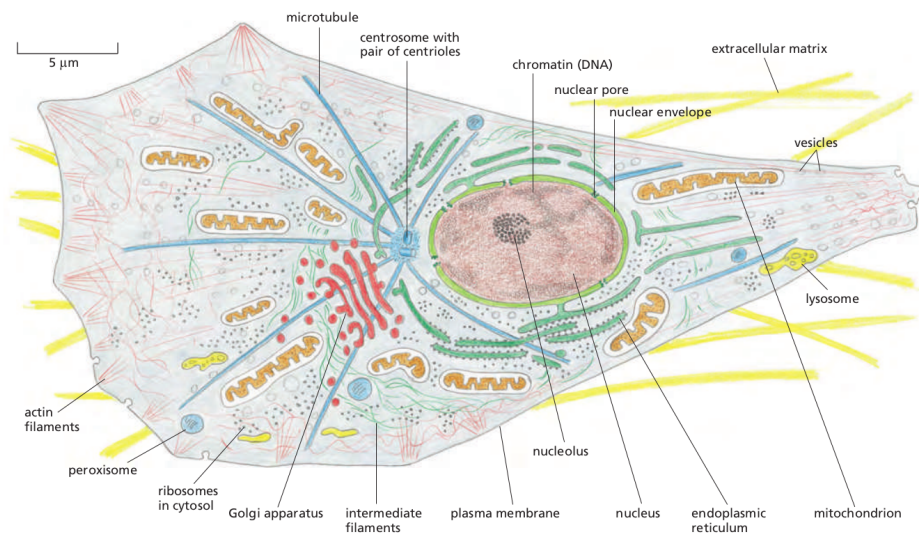


Figura 1.1: La célula eucariota y sus principales características (fuente: [?])

que se rompan.

Un gen es un segmento de ADN que contienen la información necesaria para la síntesis de una proteína en particular. Las proteínas son las moléculas que llevan a cabo casi todos los procesos dentro de una célula, y están compuestas por hasta 20 aminoácidos diferentes. Un gen es por lo tanto una receta que indica el orden en que se colocarán estos aminoácidos, codificada en la secuencia lineal de bases en la molécula de ADN. El genoma es la colección de todos los genes que codifican todas las proteínas que un organismo requiere para vivir. El genoma de un organismo sencillo como el de la levadura contiene alrededor de 6000 genes, mientras que el del humano contiene entre 30000 y 40000. La mayor parte del ADN humano (un 98 %) contiene regiones no codificantes, es decir, hebras que no codifican ninguna proteína en particular. Aunque en un principio se pensaba que esta enorme proporción del genoma no cumplía funcionalidad alguna (se hablaba del genoma basura o “garbage genome” en inglés), estudios recientes sugieren que, al menos en algunos casos, podría jugar un rol regulatorio en la síntesis de ciertas proteínas.

1.2. Transcripción y traducción: dogma central de la biología molecular

Para poder llevar a cabo la función de transmitir información, el ADN debe poder hacer algo más que replicarse. Debe poder expresar esa información que permite la

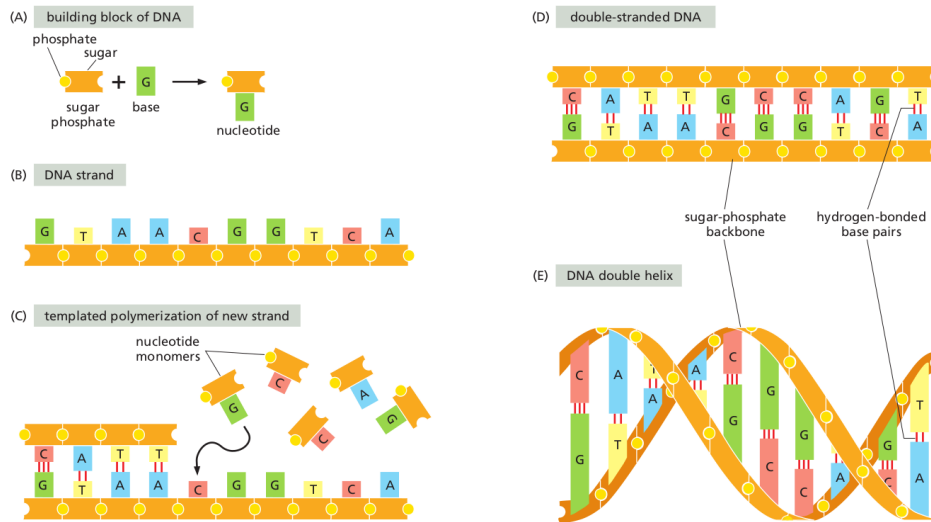


Figura 1.2: Información hereditaria en el ADN. (A) Bloques constitutivos del ADN, esqueleto azúcar-fosfato y base nitrogenada. (B) Una hebra de ADN compuesta por el esqueleto de azúcares-fosfatos y las bases. (C) Polimerización de una hebra a partir de otra que funciona como plantilla. (D) ADN completo con las dos hebras. (E) Forma final del ADN con las hebras en configuración de doble hélice. (fuente: [?])

síntesis de otros polímeros: el ARN y las proteínas.

El proceso para la síntesis de una proteína se conoce como transcripción y comienza con la síntesis de una molécula más corta de un polímero llamado ARN (ácido ribonucleico). En el ARN, la columna está conformada por el azúcar ribosa y cuatro bases, uracil (U) en lugar de timina, y las otras tres bases A, C y G son las mismas que en el ADN, apareándose cada una con su respectiva base complementaria. Durante la transcripción, las hebras de ADN se separan en la región a ser copiada y los monómeros que conforman el ARN son conectados con sus bases complementarias en el ADN (figura ??). La molécula de ARN final es una secuencia que reproduce fielmente la información del gen copiado, donde cada triplete de bases consecutivas (llamados codones) codifica cada aminoácido de la proteína a sintetizar, y es esta molécula la que es exportada desde el núcleo al citoplasma en forma de ARN mensajero (ARNm), dejando la información original intacta dentro del núcleo celular.

Esta molécula de ARNm será luego utilizada por el ribosoma, una maquinaria catalítica compleja consistente en más de 50 proteínas ribosomales diferentes y varias moléculas de ARN ribosomal, para sintetizar la proteína codificada por el gen, en un proceso llamado traducción. Todo el proceso completo de transcripción y traducción se conoce como dogma central de la biología molecular. Si bien cada célula que compone un organismo complejo posee el mismo ADN, células tomadas de distintos órganos realizan

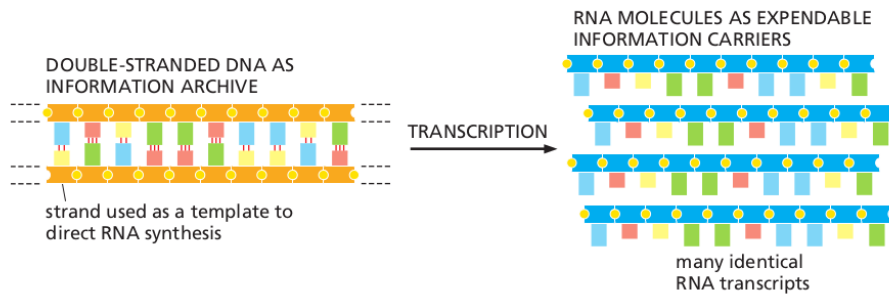


Figura 1.3: Proceso de transcripción de información genética (fuente: [?])

diferentes funciones, al igual que las proteínas en los mismos. Por ejemplo, las células de la retina requieren moléculas fotosensibles, mientras que las células que componen el hígado no las requieren. Existe entonces un proceso conocido como diferenciación dentro de cada célula. En lugar de sintetizar todas las posibles proteínas, la célula regula los niveles de transcripción y traducción de los genes que codifican las proteínas necesarias para la misma y únicamente esas proteínas son las que serán sintetizadas.

En un dado momento, la célula puede requerir muchas proteínas de un tipo y pocas de otro, es decir, en un dado momento cada gen individual puede expresarse a niveles diferentes. La transcripción de un gen (la orden de comenzar a copiarlo o de finalizar la copia) es regulada por proteínas especiales llamadas factores de transcripción, que se ligan a regiones específicas del ADN fuera de la región codificante, que inicia o suprime la transcripción. Esto lleva a la asunción en que se basa el análisis de expresión genética: el estado biológico de una célula queda determinado por su perfil de expresión, es decir, los niveles de expresión de cada gen individual en el genoma, que pueden ser inferidos a partir de las concentraciones de ARNm.

Conocer cuales son los genes que se expresan frente a determinados estímulos, puede brindar información sobre la función que realizan las proteínas codificadas por los mismos en el organismo, información clave para comprender las bases de enfermedades complejas como el cáncer.

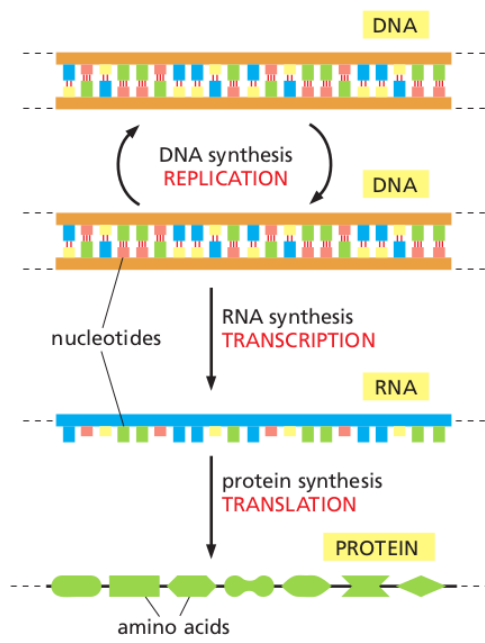


Figura 1.4: Proceso de transcripción y traducción de información genética: dogma central de la biología molecular (fuente: [?])

Capítulo 2

Materiales y Metodos

Las técnicas de relevamientos transcripcionales de gran escala, tales como las micromatrices de ADN y secuenciamientos de ARN (secuenciadores de próxima generación), permiten el monitoreo en paralelo de la totalidad del genoma. En este capítulo daremos una introducción al funcionamiento del primer tipo de tecnologías, que será la que usaremos extensivamente en este trabajo, y a los diferentes conjuntos de datos que utilizaremos. [14]

2.1. Micromatrices de ADN

La tecnología de micromatrices de ADN se constituyó como una herramienta indispensable para el monitoreo de niveles de expresión a lo largo de todo el genoma de un organismo, estimando la concentración de ARNm que está siendo exportado desde el núcleo celular hacia el citoplasma para la síntesis de determinadas proteínas.

Una micromatriz es típicamente un portaobjetos de vidrio u otra superficie sólida a la cual se le adosan de forma ordenada y en lugares específicos (llamados sondas) moléculas de ADN. Un mismo sitio puede contener varios millones de copias de moléculas idénticas de ADN de composición conocida (tanto genómico como hebras cortas de oligo-nucleótidos) que se corresponden de forma unívoca con un gen. Una micromatriz de ADN puede medir en simultaneo los niveles de expresión de hasta 40000 genes distintos.

Dependiendo de la tecnología utilizada, las micromatrices pueden ser de canal único o de doble canal.

En las micromatrices de un solo canal, las moléculas de ARNm son extraídas de las células de interés del organismo y mediante diversas técnicas son transcritas inversamente a ADN. Luego, el ADN es transcrito nuevamente a ARNm utilizando ARN marcado con un compuesto fluorescente (biotina). Estas copias marcadas y aumentadas son luego colocadas en la micromatriz, permitiendo que el ARNm se difunda por toda la misma. Cuando el ARNm encuentra una sonda que contiene su copia complementaria, se hi-

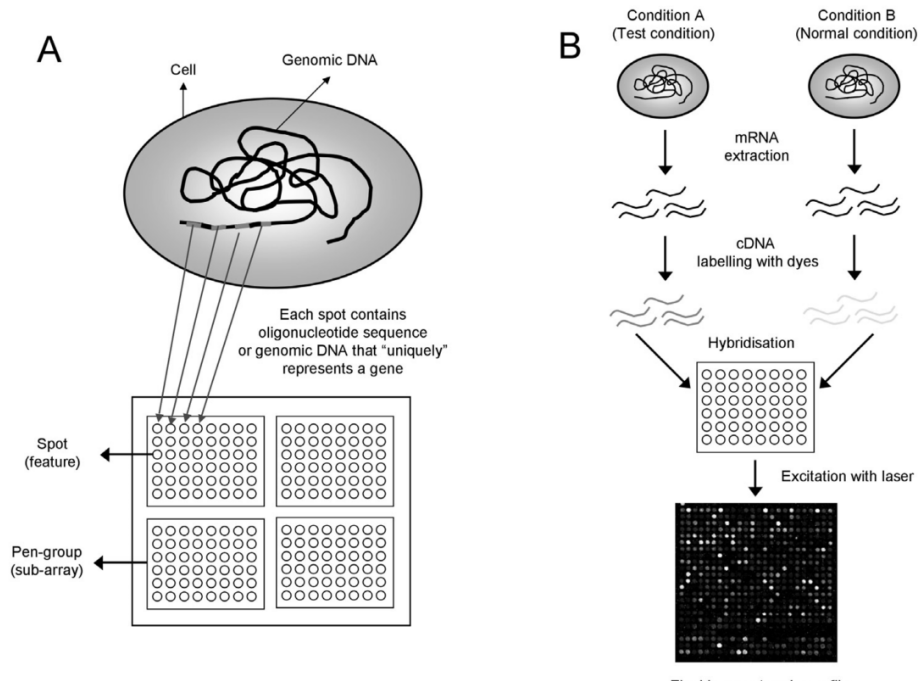


Figura 2.1: Funcionamiento básico de una micromatriz de ADN **Hacer esta figura nuevamente**

bridiza con la misma, es decir se pega con una afinidad mucho mayor con la que se puede pegar a cualquier otra. Al lavarse la solución de ARNm, solo aquellos que se hibridizaron con la copia complementaria se mantienen unidos. Finalmente, se ilumina la micromatriz con luz laser de longitud adecuada y se mide la cantidad de fluorescencia emitida por cada sonda. Esta cantidad está asociada a la cantidad de ácido nucleico que se ligó a una dada sonda y eso a su vez será proporcional a la concentración de ese ARNm particular en el tejido de interés.

El resultado de un experimento con micromatrices es una tabla o matriz de expresión de $N_g \times N_m$ donde cada fila corresponde a los niveles de expresión de cada gen particular ($N_g \approx 20000$ genes), y cada columna a cada muestra ($N_m \approx 15$ muestras) de tejido tomada.

Estos tecnologías plantean entonces el problema de como analizar bastas cantidades de datos para obtener información de interés, como ser:

1. La identificación de los genes que forman parte de algún proceso biológico
2. Agrupar tumores para su clasificación clínica
3. Proveer evidencia de la función de proteínas cuyo rol en el organismo se desconoce

En la actualidad, la aparición de tecnologías más rápidas y económicas de secuenciamiento, conocidas colectivamente como Next-generation sequencing (Secuenciamiento de próxima generación), están comenzando a dejar obsoleta la tecnología de micromatrices. Sin embargo, las mismas siguen siendo una herramienta útil en el estudio de los perfiles de expresión genética.

En este trabajo, analizaremos el conjunto de datos Wiegel, datos obtenidos mediante esta tecnología. [?, ?, 6]

2.2. Conjunto de datos Wiegel

En el marco del proyecto AtGenExpress, (un esfuerzo multinacional desarrollado para descubrir el transcriptoma del organismo modelo multicelular *Arabidopsis thaliana*), el grupo *Weigel & Lohmann*, de Alemania, realizó en el año 2004 un exhaustivo estudio de expresión del transcriptoma de *Arabidopsis thaliana* utilizando las micromatrices de ADN Affymetrix ATH1, con el objetivo de comprender las complejas redes de genes que, se conjetura, controlan la tolerancia de la planta al estrés. Para ello, se sometió a plantas de *Arabidopsis*, de idéntico genotipo y de idénticas condiciones de crecimiento, a diversos tratamientos de estrés.

Los tratamientos de estrés se realizaron de tal forma de excluir efectos circadianos (oscilaciones de las variables biológicas en intervalos regulares de tiempo asociadas con un cambio ambiental rítmico), tomando muestras o de la raíz (root) o del tallo (shoot) en dos réplicas biológicas cada 0 minutos, 30 minutos, 1 hora, 3 horas, 6 horas, 12 horas y 24 horas luego del comienzo del tratamiento. En algunos de los tratamientos, por ejemplo, de luz ultravioleta, las alteraciones transcripcionales producto del estrés son fueron tan rápidas que se tomaron además muestras a los 15 minutos del comienzo del mismo. Las muestras de control se tomaron de plantas no sometidas a ningún tratamiento de estrés de la misma forma que con las plantas tratadas.

Además de un tratamiento de control, se realizaron los siguientes tratamientos de estrés:

Tratamiento de frío

Las cajas conteniendo las plantas fueron transferidas a hielo para un rápido enfriamiento y mantenidas a 4°C en un cuarto frío hasta la cosecha.

Tratamiento de calor

Las cajas fueron transferidas a una incubadora y sometidas a una temperatura de 38°C durante 3 horas antes de la cosecha.

Tratamiento osmótico y de sal

Se removieron las balsas de polipropileno que sostienen a las plantas y se agregaron a la solución acuosa, manitol y NaCl en una concentración final de 300 mM y 150 mM respectivamente. Luego, se devolvieron las balsas a su lugar hasta la cosecha.

Tratamiento de heridas

Se hirió a las plantas utilizando un elemento punzante consistente en 16 agujas, tres veces por hoja, dejando en promedio entre 3 y 4 agujeros.

Tratamiento de sequía

Las plantas fueron expuestas a una corriente de aire durante 15 minutos, lapso durante el cual perdieron un 10 % de su peso. Luego, se las devolvió a la cámara de cultivo hasta la cosecha.

Tratamiento con luz ultravioleta B

Se irradió a las plantas durante 15 minutos con luz ultravioleta B. Bajo estas condiciones se induce una respuesta de la planta tanto para daño por radiación de onda corta como para radiación ultravioleta.

Además de estos tratamientos, se sometió de forma similar a tratamientos oxidativos, de genotoxicidad y de calor y recuperación. **en el paper no figura la información de los tratamientos de genotoxic, oxidative y heat and recovery** [?, ?]

2.3. PIN - Redes de interacción de proteínas

Las redes son construcciones útiles para esquematizar la organización de las interacciones en distintos tipos de sistemas. Las redes permiten tener una visión global de cómo están organizadas dichas interacciones.

La mayor parte de las funciones biológicas en una célula es llevada a cabo por proteínas a través de procesos de interacción física entre ellas, por ejemplo formando complejos proteicos. Por lo tanto, es de fundamental importancia conocer no solo los niveles de expresión de una dada proteína, sino también, en simultáneo, las interacciones físicas que la misma podría llevar a cabo con otras proteínas. El registro en forma global de estas interacciones conforma lo que se denomina red de interacción de proteínas o PIN, y si la misma contempla la totalidad de las proteínas de una dada especie, la PIN correspondiente se conoce como interactoma completo.

2.3.1. PIN AI1 y LCI binaria

A lo largo de esta tesis se analizaron dos redes de interacción de proteínas con el objetivo de utilizarlas como referencia.

La primera, una red experimental de interacciones binarias de alta confianza establecida entre 2700 proteínas [?] que reporta 5700 interacciones entre las mismas. Para generar este interactoma, el Consorcio de Mapéo del Interactoma de Arabidopsis utilizó una colección de aproximadamente 8000 marcos abiertos de lectura (secuencias de ARN comprendidas entre un codón de inicio de traducción y un codón de terminación) representando alrededor del 30 % de los genes codificantes. Probaron todas las interacciones de a pares con un método conocido como *Sistema de doble híbrido* (Y2H por sus siglas en inglés), consistente en la activación de un gen reportero mediante la acción de un factor de transcripción sobre la secuencia regulatoria. En esta técnica, el factor de transcripción es separado en dos fragmentos, uno que reconoce la secuencia regulatoria y otro que promueve la activación de la transcripción. Estos dos fragmentos son luego conectados cada uno a cada una de las dos proteínas (llamadas carnada y presa) que se desean analizar. Si las dos proteínas son capaces de interactuar físicamente, el factor de transcripción se reconstituirá y se activará el gen reportero, visualizándose como crecimiento en un medio específico o una reacción con cambio de color. [?]

Utilizando los pares obtenidos confeccionaron un conjunto de datos consistente en 5664 interacciones binarias entre 2661 proteínas, llamado Arabidopsis Interactome versión 1 “main screen”, que llamaremos $AI1_{main}$.

La segunda red utilizada fue una red binaria de interacción de proteínas, que llamaremos, $LCI_{binaria}$, obtenida de [?], material suplementario, tabla 4, consistente en aproximadamente 4300 interacciones entre alrededor de 2200 proteínas de *Arabidopsis*. La misma fue obtenida mediante curado manual de literatura, es decir, en lugar de realizar ensayos de alto rendimiento en busca de pares de proteínas interactuantes, se realiza una revisión exhaustiva de la literatura existente en busca de interacciones que aparezcan en ensayos de pequeña escala previamente realizados sobre pocas proteínas y motivados por hipótesis previas (hypothesis-driven en inglés), ensayos altamente fiables. [?]

El solapamiento observado entre ambas se encuentra en el rango esperado dado la cobertura del proteoma que hacen estas redes, como muestra el diagrama de la figura ??.

2.4. KEGG - Vías metabólicas

Una vía metabólica es un conjunto de reacciones químicas que suceden dentro de una célula. En una vía, la sustancia química inicial, llamada metabolito, es modificada por una serie de reacciones químicas catalizadas por enzimas. En estas reacciones, el producto de una enzima es utilizado como sustrato por la siguiente enzima y así hasta alcanzar un producto final, que puede usarse inmediatamente, almacenarse o

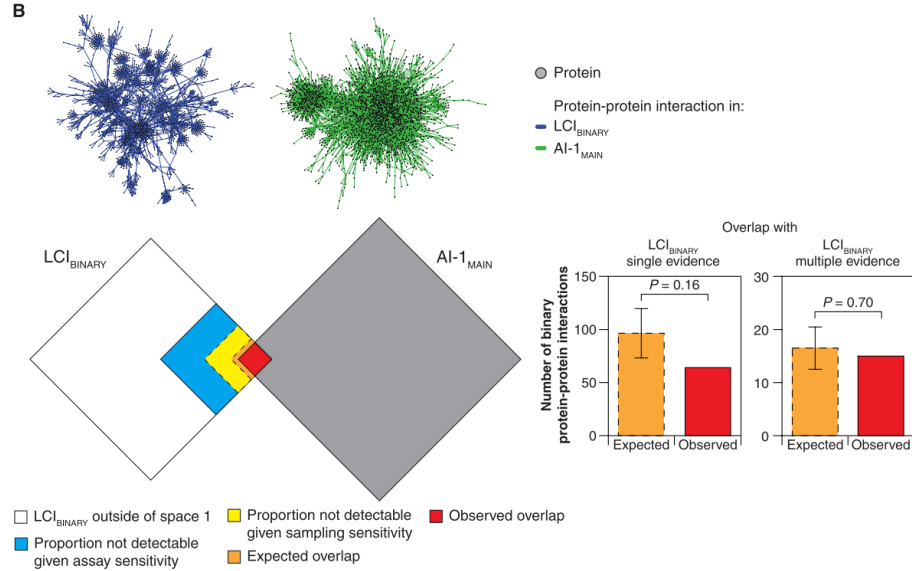


Figura 2.2: (Arriba) Representación de las redes $LCI_{binaria}$ (azul) y $AI1_{main}$ (verde). (Abajo a la izquierda) Los conjuntos de datos son representados por diagramas de Venn cuadrados. El tamaño es proporcional al número de interacciones. (Abajo a la derecha) Los solapamientos observados y esperados de $AI1_{main}$ con $LCI_{binaria}$ (fuente: [?])

iniciar una nueva vía metabólica. El metabolismo de una célula consiste en una red o vías interconectadas que permiten la síntesis o ruptura de las moléculas, acciones conocidas como anabolismo y catabolismo, respectivamente. Descubrir este tipo de redes es fundamental para obtener una imagen global de la actividad celular (figura ??).

La Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto (KEGG, por sus siglas en inglés), es una base de datos sobre diversos genomas, vías biológicas, enfermedades, drogas y sustancias químicas. La misma provee de una base de datos de vías metabólicas que contiene recursos para la representación de procesos celulares tales como el metabolismo, transducción de señales y ciclo celular. La figura ?? muestra un mapa KEGG de la vía metabólica de *Arabidopsis Thaliana* “Synthesis and degradation of ketone bodies”. En la misma, se puede observar que a priori, la estructura de una vis metabólica excede el lenguaje de redes. Las interacciones metabólicas suelen involucrar sustratos, productos y enzimas en relaciones que son difícil de capturar utilizando únicamente interacciones binarias. En nuestro trabajo utilizamos el abordaje de Gabriele Sales y colaboradores [?] para mapear vías metabólicas en redes.

Se conformó una red uniendo todas las vías metabólicas presentes en la base de datos y teniendo en cuenta solamente aquellos genes presentes en el conjunto de datos Weigel, obteniéndose una red de 1992 nodos y 23009 arcos. [?, ?]

2.5. GO - Ontología genética

Poder comparar y clasificar entidades es un mecanismo fundamental de las ciencias biológicas. El advenimiento de tecnologías de alto rendimiento hace que sea necesario adoptar sistemas de representación del conocimiento que sean objetivos y estandarizados. Esto llevó al desarrollo de diversas ontologías para anotación de genes y de sus productos, y en particular, al desarrollo de la Ontología Génica (Gene ontology, GO por sus siglas en inglés). El proyecto de Ontología Génica (GO) es un consorcio que intenta mantener un vocabulario y una descripción consistente de conceptos biológicos a lo largo de distintas bases de datos. Esta ontología provee un vocabulario controlado de términos definidos para caracterizar las propiedades de productos génicos (proteínas y secuencias de ARN, por ejemplo).

El proyecto GO consta de tres ontologías estructuradas que describen los productos génicos en terminos de sus procesos biológicos asociados (ontología *Biological Process*, BP), de sus componentes celulares (ontología *Cellular Component*, CC) y de sus funciones moleculares (ontología *Molecular Function*, MF).

Un termino de un proceso biológico (BP) describe una serie de eventos realizados por uno o varios grupos de eventos moleculares con un comienzo y un fin definidos, por ejemplo, “proceso celular fisiológico” o “transducción de señal”. Un proceso biológico no es equivalente a una vía metabólica ya que no intenta representar la dinámica o dependencias de la misma.

Un término de componente celular (CC) describe un componente de una célula que es parte de un objeto mayor, como ser una estructura anatómica (por ejemplo, retículo endoplasmático rígido, núcleo, etc.) o un grupo de productos génicos (por ejemplo, ribosoma, proteasoma, etc.).

Finalmente, los términos de función molecular (MF) describen las actividades que ocurren a nivel molecular, por ejemplo, “actividad catalítica” o “actividad de transporte”. Cada una de estas tres ontologías está estructurada como un grafo acíclico dirigido (DAG por sus siglas en inglés).

Cada nodo representa un término que describe alguna función. Los términos se unen entre si mediante relaciones direccionales del tipo “es un” o “es parte de”, donde el primero expresa una relación de clase-subclase y el segundo una relación de parte-todo (figura ??). Cuando un producto génico es descrito por un termino GO, se dice que el mismo está anotado en ese término, ya sea de forma directa o a través de herencia, ya que estar anotado en un término implica estar anotado en todos los términos ancestrales, regla conocida como *regla del camino verdadero*.

Formalmente, podemos describir estas relaciones de la ontología GO de la siguiente manera:

Sea $C = \{c_i / 1 \leq i \leq N\}$ un conjunto ordenado finito de conceptos que representan términos GO. Los mismos se relacionan entre si a través de las relaciones antes consignadas, de tal forma que $c_i \rightarrow c_j$ denota que c_i es un/es parte de c_j . Basado en

esto, es posible definir una relación binaria sobre C , denotada por \preceq , tal que $c_i \preceq c_j$, es decir c_j es un ancestro de c_i en la jerarquía GO. Notar entonces que si $c_k \preceq c_i$ y $c_i \preceq c_j \Rightarrow c_k \preceq c_j$ (regla del camino verdadero). En cada grafo existe un término raíz de la jerarquía r , tal que $c_i \preceq r \forall c_i \in C$.

Los conceptos más generales se hallarán más próximos al término raíz, mientras que los más específicos e informativos se alejarán del mismo. La anotación de un gen o producto génico se realiza siempre al nodo mas específico, pudiendo ser anotado además en varios conceptos biológicos a la vez.

Una anotación en GO para un dado producto génico consiste en un término GO junto con una referencia que describe el tipo de trabajo o análisis que se realizó para asociar un gen con un término específico. Cada anotación debe además incluir un código de evidencia que indica la forma en que se justifica la anotación a un término particular, lo que le confiere un grado de fiabilidad.

En particular, existen dos grupos de anotaciones, aquellas que fueron curadas manualmente y aquellas que fueron inferidas de anotaciones electrónicas (IEA). Este último tipo de anotaciones funcionales se realiza de forma automatizada sin que intermedie un curador e involucran comparaciones por similitud de secuencia o anotaciones transferidas de bases de datos y por lo tanto poseen una baja calidad y una gran cobertura, formando alrededor del 40 % de las anotaciones totales. Además, dentro del grupo de las anotaciones que fueron curadas manualmente, se tienen aquellas que fueron inferidas por medio de experimentos (IDA, IEP, IGI, IMP, IPI), aquellas que fueron inferidas por medio de análisis computacional (IBA, ISS, RCA, ISM). La tabla ?? muestra una descripción de cada código de anotación.

La figura ?? muestra la fracción que representa cada tipo de anotación para cada ontología.

Las cantidad total de anotaciones para BP, MF y CC, sin tener en cuenta aquellas pertenecientes a la categoría IEA, totalizan 2540816, 207087 y 1043851 anotaciones respectivamente. En particular, en este trabajo se tuvieron en cuenta únicamente las evidencias obtenidas experimentalmente. Para ello, se tomaron dos subconjuntos de anotaciones de la ontología BP, que llamaremos BPA, consistente en las anotaciones IDA, IPI, IGI, IMP, con un total de 512235 anotaciones y BPB, consistente en las anotaciones IDA, IPI, IGI, IMP y IEP, con un total de 573688. Además, se utilizó un subconjunto de la ontología CC, consistente en las anotaciones IDA, IPI, IGI, IMP, con un total de 693991 anotaciones. citePandey2008, Resnik1995, Bose2016, Pesquita2009, Berenstein2014, Ashburner

Anotación (inferida de)	Siglas	Tipo	Descripción
Ensayo directo	IDA	Experimental	Indica que se llevó a cabo un ensayo directo para determinar la función, proceso o componente indicado por el término GO.
Patrón de expresión	IEP	Experimental	Cubre casos donde la anotación fue inferida por el tiempo o lugar de expresión de un gen.
Interacción genética	IGI	Experimental	Incluye cualquier combinación de alteraciones en la secuencia (mutaciones) o la expresión de más de un gen/producto génico.
Fenotipo mutante	IMP	Experimental	Cubre los casos donde la función, proceso o localización celular de un producto génico es inferido basado en diferencias en la función, proceso o localización celular entre dos alelos diferentes del gen correspondiente.
Interacción física	IPI	Experimental	Cubre interacciones físicas entre la entidad de interés y otra molécula (como ser proteínas, iones o complejos).
Aspecto biológico de un ancestro	IBA	Análisis comp.	Tipo de evidencia filogenética en donde un aspecto de un descendiente es inferido a través de la caracterización de un aspecto de un gen ancestral.
Secuencia o similitud estructural	ISS	Análisis comp.	Se utiliza cuando un análisis basado en secuencia forma la base de la anotación y la revisión de la misma se realiza de forma manual.
Análisis computacional revisado	RCA	Análisis comp.	Se utiliza para anotaciones realizadas en base a predicciones de análisis computacional de conjuntos de datos de experimentos de gran escala.
Modelo de secuencia	ISM	Análisis comp.	Se utiliza cuando la evidencia de algún tipo de modelo estadístico es usada para realizar predicciones sobre un producto génico.

Cuadro 2.1: Códigos de evidencia GO

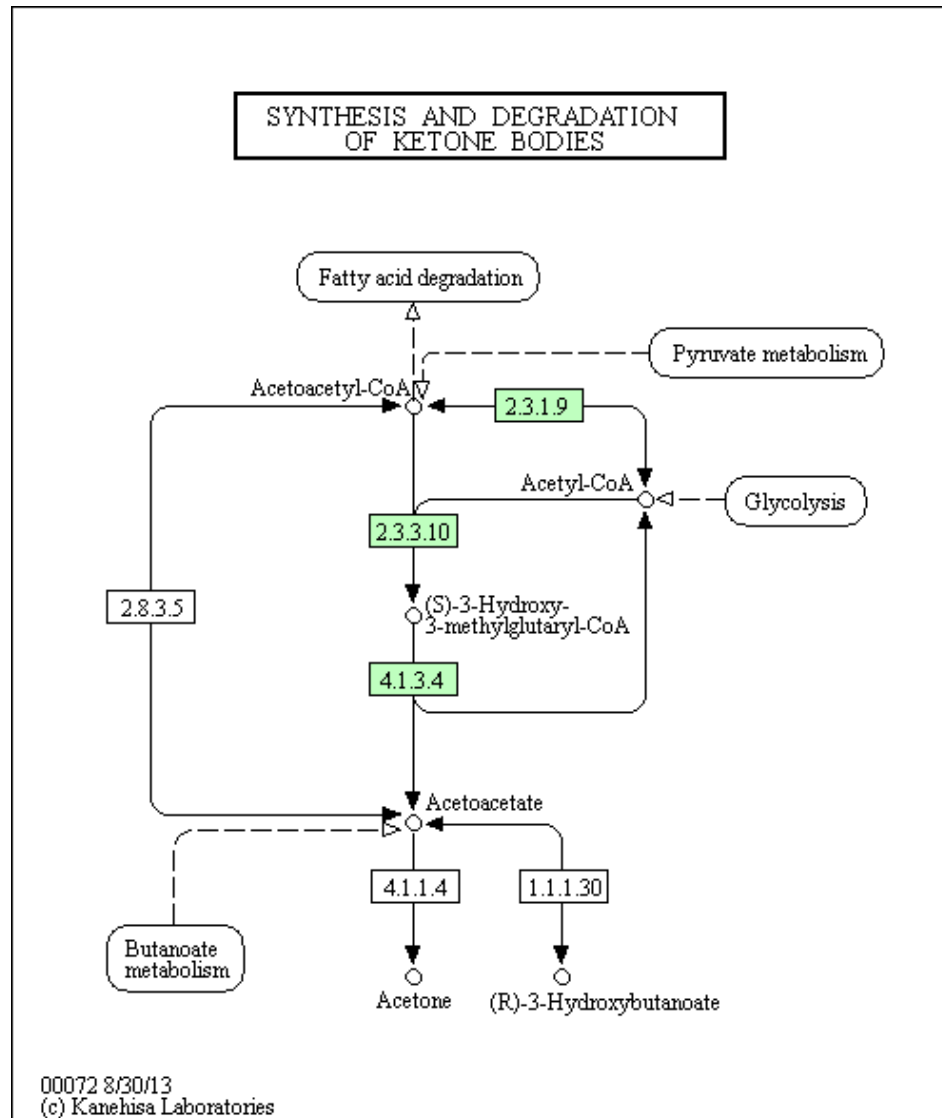


Figura 2.3: Mapa KEGG de la vía metabólica de *Arabidopsis thaliana* *Synthesis and degradation of ketone bodies*

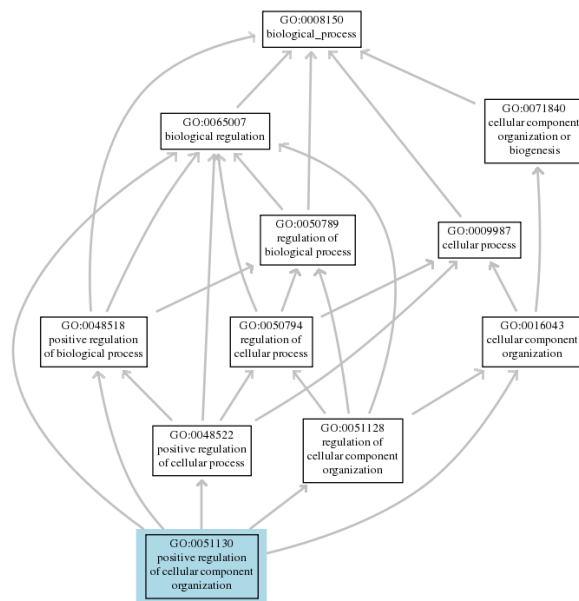


Figura 2.4: Subgrafo de la ontología BP de GO mostrando el proceso biológico “Positive regulation of cellular component organization”.

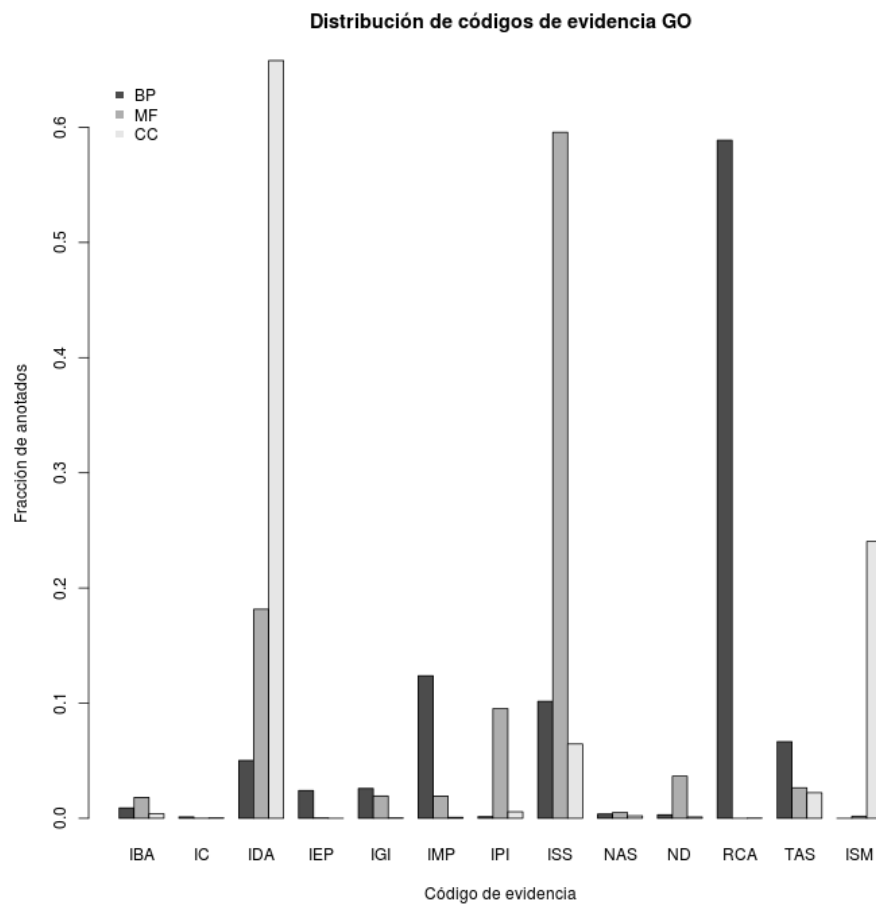


Figura 2.5: Códigos de evidencia en cada una de las ontologías y la fracción del total que representan. [comentar mas](#)

Capítulo 3

Métodos de agrupamiento de datos

Un método de agrupamiento de datos o método de “clustering”, es un método de clasificación no supervisado que permite la partición de un conjunto de N objetos en K grupos o clases, de tal forma que los objetos miembro de un grupo sean más similares entre si (en algún sentido a definir) que entre los miembros de otros grupos.

Son métodos no supervisados ya que en un proceso de agrupación no existen clases definidas previamente ni ejemplos de que tipo de relaciones se desea encontrar entre los objetos, por lo que el mismo proceso debe generar las clases iniciales a las cuales asignar los objetos en el proceso de clasificación.

Estas técnicas permiten el descubrimiento o identificación de distribuciones y patrones subyacentes en los datos, posibilitando obtener conclusiones sobre los mismos, lo que las hace una de las herramientas más útiles en procesos de minería de datos y aprendizaje automatizado en campos tan diversos como las ciencias sociales, las ciencias médicas y la ingeniería.

Dependiendo de los criterios utilizados para realizar la partición, un proceso de agrupamiento puede resultar en diferentes particiones. Como ejemplo de esto podemos tomar el conjunto de números $\{-5, -3, -2, 2, 3\}$. Si decidimos agruparlos por su módulo, obtendremos los conjuntos $\{-5\}$, $\{-3, 3\}$, $\{-2, 2\}$, mientras que si decidimos agruparlos por positividad o negatividad, obtendremos los conjuntos $\{-5, -3, -2\}$ y $\{2, 3\}$. También podríamos haber optado por agrupar por paridad, si son o no primos, etc. Como se observa de un ejemplo tan sencillo, es de fundamental importancia la elección de las propiedades de los objetos a partir de las cuales realizar el agrupamiento. **poner las imágenes de las dos particiones posibles del ejemplo**

En el presente trabajo nos interesará agrupar y caracterizar conjuntos de genes de un organismo modelo, la planta *Arabidopsis thaliana*, en base a sus perfiles de expresión génica a lo largo de diversos tratamientos. [1–3]

Discutiremos a continuación diferentes metodologías y criterios de similaridad que pueden ser considerados para ello.

3.1. Similaridad, distancia y disimilaridad

Las distancias y similitudes tienen un rol preponderante en el análisis de agrupamiento de datos y por regla general son conceptos recíprocos.

Una medida de similitud o coeficiente de similitud se utiliza para indicar de forma cuantitativa la fuerza de la relación entre dos objetos del conjunto. Los $i = 1, 2, \dots, N$ objetos de un conjunto E pueden ser definidos en términos de las coordenadas \vec{X}_i de sus puntos representativos en un espacio $d - dimensional$. Sean $\vec{x} = \{x_0, x_1, \dots, x_d\}$ e $\vec{y} = \{y_0, y_1, \dots, y_d\}$ dos puntos $d - dimensionales$. Entonces, el coeficiente de similitud entre ambos será una función de sus atributos:

$$s(\vec{x}, \vec{y}) = s((x_0, x_1, \dots, x_d), (y_0, y_1, \dots, y_d)) \quad (3.1)$$

con s una función simétrica, es decir, $s(\vec{x}, \vec{y}) = s(\vec{y}, \vec{x})$. Cuanto mayor es el coeficiente de similitud, mayor es la similitud entre ambos.

Por otro lado, las medidas de disimilitud o de distancia se comportan de forma inversa, a mayor distancia o disimilitud, más diferentes son dos puntos. Una métrica de distancia es una función $d \in R$ definida sobre un conjunto E que cumple las siguientes propiedades:

1. No-negatividad: $d(\vec{x}, \vec{y}) \geq 0$
2. Reflexividad: $d(\vec{x}, \vec{y}) = 0 \iff \vec{x} = \vec{y}$
3. Conmutatividad: $d(\vec{x}, \vec{y}) = d(\vec{y}, \vec{x})$
4. Desigualdad triangular: $d(\vec{x}, \vec{y}) \leq d(\vec{x}, \vec{z}) + d(\vec{z}, \vec{y})$

con $\vec{x}, \vec{y}, \vec{z}$ objetos arbitrarios del conjunto.

Una medida de disimilitud es una métrica si cumple con las propiedades antes enunciadas.

Aunque no pareciera existir una definición formal de métrica de similitud, Chen y colaboradores definen una métrica de similitud como una función s que cumple:

1. $s(\vec{x}, \vec{y}) = s(\vec{y}, \vec{x})$
2. $s(\vec{x}, \vec{x}) \geq 0$
3. $s(\vec{x}, \vec{x}) \geq s(\vec{x}, \vec{y})$
4. $s(\vec{x}, \vec{x}) = s(\vec{y}, \vec{y}) = s(\vec{x}, \vec{y}) \iff x = y$
5. $s(\vec{x}, \vec{y}) + s(\vec{y}, \vec{z}) \leq s(\vec{x}, \vec{z}) + s(\vec{y}, \vec{y})$

La condición 5 indica que la similaridad entre \vec{x} y \vec{z} a través de \vec{y} no es mayor que la similaridad directa entre \vec{x} y \vec{z} sumada a la autosimilaridad de \vec{y} . Esta propiedad es el equivalente de la desigualdad triangular para una distancia métrica.

Si bien es deseable que una similaridad o disimilaridad sea una métrica, existen muchas medidas de similaridad o disimilaridad que dan excelentes resultados en técnicas de agrupamiento de datos sin ser métricas, es decir, sin que necesariamente cumplan la desigualdad triangular o el ítem 5 de métrica de similaridad. [4]

Finalmente, los objetos del conjunto pueden ser especificados por medio de una “matriz de distancia” de $N \times N$ cuyos elementos d_{ij} indican la disimilaridad entre los puntos i y j . [1–3, 5]

3.1.1. Medidas de distancia

El análisis de datos de expresión genética se basa principalmente en la comparación de perfiles de expresión génica. Para poder comprarlos, se requiere una medida que cuantifique cuan similares o disimilares son los objetos considerados. La elección de una medida de distancia será entonces de fundamental importancia para lograr agrupamientos que tengan sentido en el contexto de los datos analizados. En las subsiguientes secciones se listarán las medidas de distancia más comúnmente utilizadas en el agrupamiento de datos (no necesariamente de datos de perfiles de expresión).

Distancia euclidiana

La distancia euclidiana es probablemente la distancia más utilizada en el contexto de datos numéricos. Para dos puntos \vec{x} e \vec{y} en un espacio $d - dimensional$, la distancia euclidiana se define como:

$$d_{euc}(\vec{x}, \vec{y}) = \left[\sum_{i=1}^d (x_i - y_i)^2 \right]^{\frac{1}{2}} = [(\vec{x} - \vec{y})(\vec{x} - \vec{y})^T]^{\frac{1}{2}} \quad (3.2)$$

con x_i e y_i los valores de la i ésima componente de \vec{x} e \vec{y} respectivamente.

Distancia Manhattan o Taxicab

La distancia Manhattan o taxicab es llamada así por ser la distancia que debería recorrer un taxi en una ciudad para ir de un punto a otro, suponiendo la ciudad como una cuadrícula perfecta. Para dos puntos \vec{x} e \vec{y} en un espacio $d - dimensional$, la distancia Manhattan se define como:

$$d_{man}(\vec{x}, \vec{y}) = \sum_{i=1}^d |(\vec{x} - \vec{y})| \quad (3.3)$$

Distancia máxima

Para dos puntos \vec{x} e \vec{y} en un espacio d – *dimensional*, la distancia máxima se define como:

$$d_{max}(\vec{x}, \vec{y}) = \max_{1 \leq i \leq n} |x_i - y_i| \quad (3.4)$$

Distancia de Minkowsky

Para dos puntos \vec{x} e \vec{y} en un espacio d – *dimensional*, la distancia de Minkowsky se define como:

$$d_{mink}(\vec{x}, \vec{y}) = [\sum_{i=1}^d (x_i - y_i)^r]^{\frac{1}{r}}, r \geq 1 \quad (3.5)$$

r es el orden de la distancia de Minkowsky. Notar que si tomamos $r = 2, 1$, ínf obtenemos la distancia euclidiana, la Manhattan y la máxima, respectivamente.

Coefficiente de correlación de Pearson

Una de las métricas más utilizadas para medir similaridad entre perfiles de expresión, como los presentados en la figura 1.1c, es el coeficiente de correlación de Pearson [6]. El coeficiente de correlación fue desarrollado por Karl Pearson basado en ideas introducidas por Francis Galton alrededor del año 1880.

Para dos puntos \vec{x} e \vec{y} en un espacio d – *dimensional*, representando el perfil de expresión de dos genes a lo largo de un dado tratamiento, el CCP se define como:

$$r(\vec{x}, \vec{y}) = \frac{\sum_{i=1}^d (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{[\sum_{i=1}^d (x_i - \bar{x})^2]^{\frac{1}{2}} [\sum_{i=1}^d (y_i - \bar{y})^2]^{\frac{1}{2}}} \quad (3.6)$$

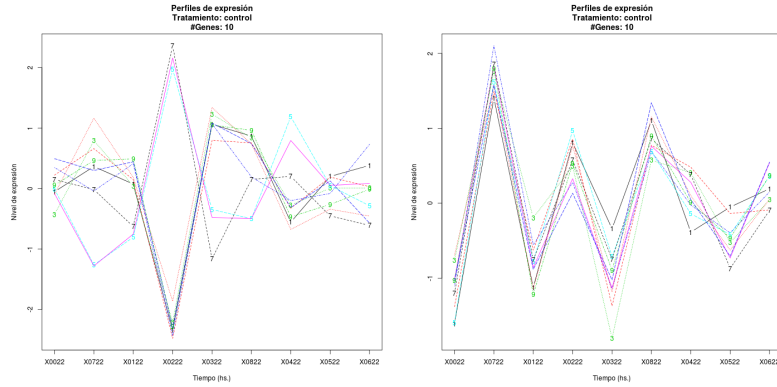
El centrar alrededor de la media permite comparar la forma de ambos perfiles, en lugar de su magnitud.

Valores altos de r implican que las fluctuaciones respecto de la media de las respectivas componentes se encuentran “en sincronía”. En caso de no estarlo el valor esperado tiende a cero. Finalmente si las fluctuaciones tienden a ocurrir “sincronizadamente” pero en sentidos opuestos $r \Rightarrow -1$.

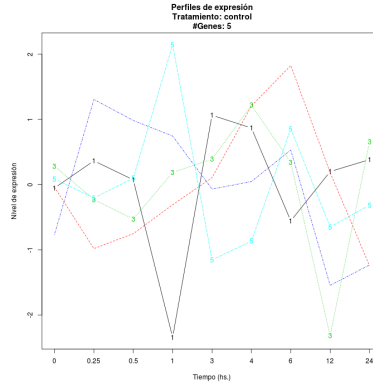
En nuestro caso, $r = +1$ corresponde a genes que estan siendo coexpresados por la maquinaria celular, mientras que $r = -1$ a genes anti-coexpresados. En el primer caso los perfiles de ambos genes (apropiadamente reescalados) coinciden perfectamente, mientras que en el segundo son perfectamente opuestos.

La correspondiente medida de distancia puede ser calculada como [7]:

$$d_{ccp}(\vec{x}, \vec{y}) = 1 - r(\vec{x}, \vec{y}) \quad (3.7)$$



(a) Perfiles de expresión para el tratamiento *Control* de 10 genes que están co-regulados. (b) Perfiles de expresión para el tratamiento *Control* de 10 genes que están anti co-regulados.



(c) Perfiles de expresión para el tratamiento *Control* de cinco genes tomados al azar.

Figura 3.1: Distintos grupos de perfiles de expresión

o alternativamente:

$$d_{ccp}(\vec{x}, \vec{y}) = 1 - |r(\vec{x}, \vec{y})| \quad (3.8)$$

En el caso de la distancia definida en 1.8, al tomar el valor absoluto del CCP, genes cuyos perfiles son iguales pero opuestos (están anti-coexpresados) pueden encontrarse más cerca en el sentido de d_{ccp} que aquellos que son expresados hacia arriba o abajo pero en distintas magnitudes. Por lo tanto, esta distancia permite encontrar grupos de genes que son coexpresados, sin importar en que sentido (Figura 1.1a) sean coexpresados. En el caso de la distancia definida en 1.7, solamente se consideran cercanos aquellos genes cuyos perfiles sean coexpresados o bien hacia arriba o bien hacia abajo (Figura 1.1b). [1, 5, 6, 8]

En el presente trabajo se utilizará como distancia la definida en 1.7 para encontrar grupos de genes que únicamente se hayan coexpresado o bien hacia arriba o bien hacia abajo. [9]

3.1.2. Similaridad semántica

La adopción de ontologías provee los medios para comparar aspectos de entidades que de otra forma no podrían ser comparados. Por ejemplo, si dos productos génicos son anotados dentro del mismo esquema, es posible compararlos mediante el análisis de los términos en los cuales están anotados de forma explícita utilizando medidas de similaridad semántica. Se define una medida de similaridad semántica como una función tal que dados dos términos de la ontología o un conjunto de términos en los que dos genes están anotados, la función devuelve un escalar que refleja la cercanía de sentido entre ellos.

Es posible cuantificar la similaridad semántica en una ontología representada por un grafo como GO, mediante diversas estrategias.

Comparación de términos en GO

Existen esencialmente dos formas distintas de comparar términos en GO: comparación a partir de los arcos del grafo y comparación a partir de los nodos y sus propiedades. En este trabajo estaremos interesados únicamente en comparar términos a partir de sus nodos, ya que son los nodos los que contendrán la información biológica en forma de anotaciones génicas.

Sea C el conjunto de todos los términos de una ontología GO, con un número total $\#C$ de anotaciones. Un término c_i tendrá $\#c_i$ anotaciones, ya sea directamente o por intermedio de cualquiera de sus hijos. La probabilidad de que un gen tomado al azar, sin otro tipo de información, se encuentre anotado al concepto c_i será entonces $P(c_i) = \frac{\#c_i}{\#C}$, con $P : C \Rightarrow [0 : 1]$.

Se define el contenido de información de c_i como $IC = -\log_2(P(c_i))$, cantidad en el intervalo $(0, -\log_2[\frac{1}{\#C}])$, que indica cuan específico e informativo es un término de la ontología. Para un c_i y c_j tales que $c_i \preceq c_j$, se tiene que $IC(c_i) \geq IC(c_j)$. Cuanto más específico sea un término, es menos probable que un gen dado esté anotado en el mismo, y por lo tanto, su contenido de información es mayor. El nodo raíz de la ontología tiene un contenido de información nulo, ya que es el ancestro de todos los términos de la misma y por lo tanto, saber que un concepto está anotado a la raíz no aporta información.

Si bien el IC puede tener un sesgo, ya que términos en áreas actuales de interés en investigaciones biomédicas van a estar más anotados que otros términos en otras áreas, la utilización del IC sigue teniendo un sentido desde el punto de vista de la probabilidad, porque es mucho más probable (y menos significativo) que dos genes compartan un término frecuentemente usado, que uno no tan frecuente, más allá de si ese término es frecuente porque sea genérico o porque sea un término de interés para la investigación actual.

Es posible definir una medida entre pares de términos utilizando el IC. Existen dos

formas para ello: tomar el ancestro común más informativo (MICA, por sus siglas en inglés), en donde solo el ancestro común con mayor IC es considerado, o tomar el ancestro disjunto común (DCA por sus siglas en inglés), en la cual todos los ancestros comunes disjuntos (ancestros que no tienen ancestros comunes) son considerados.

Una de las medidas de similitud semántica más comúnmente utilizadas es la medida de similitud semántica introducida por Resnik en [10], que consiste en asignar como la medida de similitud entre dos términos, el contenido de información del ancestro en común más informativo (el MICA):

$$Sim_{res}(c_i, c_j) = \max_{c \in S(c_i, c_j)} (-\log_2[P(c)]) = IC(MICA[c_i, c_j]) \quad (3.9)$$

Con $S(c_i, c_j)$ el conjunto de ancestros comunes de c_i y c_j . De esta manera, para cuantificar la información compartida (y estimar entonces su similitud semántica) se considera el contenido de información de los ancestros en común que dos términos poseen.

A modo de ejemplo, tomemos el DAG de la figura 1.2, con 9 términos o conceptos: $C = \{R, c_0, \dots, c_7\}$ y con 5 entidades mapeadas (genes anotados): $g_1 = \{5, 6, 2, 0, r\}$, $g_2 = \{5, 4, 2, 3, 0, r\}$, $g_3 = \{7, 1, r\}$, $g_4 = \{4, 3, 0, r\}$ y $g_5 = \{2, 0, r\}$. Podemos calcular la similitud semántica de Resnik entre los términos c_4 y c_5 , por ejemplo, sabiendo que $\#C = 5$ y que el ancestro común más informativo de ambos es c_0 , con $\#c_0 = 4$. Se tiene entonces que $Sim_{res}(c_4, c_5) = IC(MICA) = IC(c_0) = -\log_2(\frac{\#c_0}{\#C}) = -\log_2(\frac{4}{5}) = 0,32$. Si quisieramos calcular ahora la similitud semántica Resnik entre c_5 y c_6 , obtendríamos $Sim_{res}(c_5, c_6) = IC(c_2) = -\log_2(\frac{3}{5}) = 0,73$. Por lo tanto, para Resnik, los conceptos c_5 y c_6 son entre sí, más similares que los conceptos c_4 y c_5 .

Al considerar solo el IC del MICA, la Sim_{res} no tiene en cuenta la especificidad de los

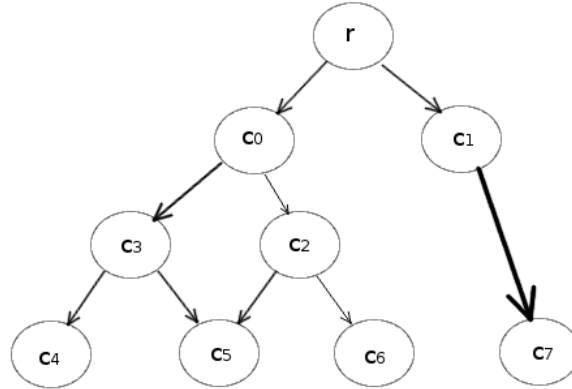


Figura 3.2: DAG con 9 términos o conceptos: $C = \{R, c_0, \dots, c_7\}$ y con 5 entidades mapeadas (genes anotados): $g_1 = \{5, 6, 2, 0, r\}$, $g_2 = \{5, 4, 2, 3, 0, r\}$, $g_3 = \{7, 1, r\}$, $g_4 = \{4, 3, 0, r\}$ y $g_5 = \{2, 0, r\}$

términos que compara, es decir, no toma en cuenta la distancia entre los términos y su

MICA. Para tomar en cuenta esta distancia, las medidas de Lin [11] y Jiang-Conrath [12] relacionan el IC del MICA con el IC de los términos a comparar:

$$Sim_{lin}(c_i, c_j) = \frac{2 \times IC(MICA[c_i, c_j])}{IC(c_i) + IC(c_j)} \quad (3.10)$$

$$Sim_{JC}(c_i, c_j) = 1 - IC(c_i) + IC(c_j) - 2 \times IC(MICA[c_i, c_j]) \quad (3.11)$$

Un inconveniente de estas medidas es que se encuentran desplazadas del grafo, es decir, estas medidas son proporcionales a las diferencias entre los IC de los términos y de sus ancestros comunes, independientemente del valor absoluto de IC del ancestro. Una restricción de todas estas medidas es que solo toman en cuenta el MICA, a pesar de que los términos GO pueden tener varios ancestros disjuntos comunes (DCA). Para evitar esta restricción, [13] propuso la aproximación GraSM, que puede ser aplicada a todas las medidas descritas anteriormente, simplemente reemplazando el IC del MICA, por el promedio de los IC de los DCA. Existen más de dos docenas de medidas de similaridad entre términos GO, y no siempre es claro cuál es el mejor para un dado propósito. Sin embargo, generalmente la elección de una medida por defecto es suficiente [14]. En este trabajo utilizaremos la Sim_{res} , por tratarse de una medida simple y efectiva.

Una vez establecida una medida de similaridad semantica entre termino GO, existen distintas formas para extender esta idea y definir una similaridad semántica entre genes. Básicamente existen 2 estrategias. La primera se basa en medidas globales (groupwise en inglés), que comparan globalmente los conjuntos de términos en los que dos genes están anotados, $GO(g_1)$ y $GO(g_2)$, por ejemplo, contando cuantos términos comparten: $|GO(g_1) \cap GO(g_2)|$. [15]

La segunda estrategia se basa en medidas de a pares (pairwise en inglés), calculando la similaridad semántica término a término de cada uno de los conjuntos $GO(g_1)$ y $GO(g_2)$ y luego aplicando sobre esta similaridad alguna operación para obtener una medida de similaridad entre estos genes.

El primer paso para esto es calcular una matriz de similaridad S de $N \times M$ que contenga la similaridad de a pares, entre todos los pares de términos de estos conjuntos, con $N = |GO(g_1)|$ y $M = |GO(g_2)|$, utilizando alguna de las medidas de similaridad semántica entre términos presentadas anteriormente (Sim_{res} , Sim_{lin} , etc.):

$$S_{ij} = Sim(GO(g_1^i), GO(g_2^j)), \forall i \in \{1, \dots, N\} \forall j \in \{1, \dots, M\} \quad (3.12)$$

Notar que esta matriz puede no ser simétrica.

Cada una de las N filas corresponde a la similaridad entre la anotación i –esima del gen 1 y todas las M anotaciones del gen 2 y cada una de las M columnas corresponde a la similaridad entre la anotación j –esima del gen 2 y todas las N anotaciones del gen 1.

A partir de S_{ij} es posible definir tres métodos para obtener una medida de similaridad

entre genes. El primer método, propuesto en [16], consiste en tomar como similaridad, la máxima similaridad entre todos los términos:

$$Sim_{max}(GO(g_i), GO(g_j)) = \max\{S_{ij}\} \quad (3.13)$$

El segundo método, propuesto en [17], consiste en tomar el valor medio de todos los valores de la matriz S_{ij} :

$$Sim_{med}(GO(g_i), GO(g_j)) = \frac{1}{N.M} \sum_{i,j} S_{ij} \quad (3.14)$$

Finalmente, el tercer método, propuesto en [13], implica tomar el valor medio de los máximos de cada fila, el valor medio de los máximos de cada columna, y quedarse con el máximo de esos dos valores. Este criterio de similaridad se conoce como *rcmax*:

$$Sim_{rcmax}(GO(g_1), GO(g_2)) = \max\left\{\frac{1}{N} \sum_i \max_{1 \leq j \leq M} S_{ij}, \frac{1}{M} \sum_j \max_{1 \leq i \leq N} S_{ij}\right\} \quad (3.15)$$

Como muchos genes están anotados en conceptos muy diversos por participar en procesos biológicos muy distintos, e incluso puede haber genes que no están anotados en ningún concepto, la medida de similaridad Sim_{med} tiende a dar valores más bajos que otros métodos. Por el contrario, la medida Sim_{max} tiende a dar valores más altos, por ser una medida más optimista. En este trabajo utilizaremos el tercer método, Sim_{rcmax} , por ser un compromiso entre ambos casos extremos. [10–14, 16, 17]

3.2. Estrategias de agrupamiento

En la sección anterior abordamos distintas metodologías para cuantificar la noción de similaridad en diversos espacios.

En lo que sigue introduciremos las diferentes estrategias de agrupamiento de datos utilizadas en este trabajo, tanto para agrupamiento de perfiles transcripcionales como de armado de comunidades en las redes presentadas anteriormente.

Es posible distinguir dos tipos de agrupamientos, conocidos como agrupamiento duro (hard clustering en inglés), y agrupamiento difuso (fuzzy clustering en inglés). En el primer caso, el de agrupamiento duro, cada objeto del conjunto de datos es asignado a un y solo un grupo, mientras que en el segundo caso, el de agrupamiento difuso, un elemento del conjunto puede pertenecer a varios grupos, con distinta probabilidad. En este trabajo utilizaremos únicamente métodos de agrupamiento duro.

3.3. Agrupamientos no jerárquicos

Además de la distinción mencionada más arriba, los métodos de agrupamiento pueden dividirse (entre otros) fundamentalmente entre agrupamientos jerárquicos y agrupamientos no jerárquicos. Las dos estrategias de agrupamientos no jerárquicos que se presentan a continuación fueron utilizadas en el desarrollo de este trabajo.

3.3.1. K-means

K-means es un método usual de agrupamiento no jerárquico en donde cada observación pertenece al grupo con la media más cercana a la observación.

El mismo comienza agrupando los objetos de forma arbitraria en K grupos distintos. El número K puede ser elegido de forma aleatoria o estimado mediante algún otro método de agrupamiento jerárquico pero es siempre fijo. Luego, se calcula un promedio de la posición de todas las observaciones de cada grupo, llamado centroide. A continuación, los objetos individuales son redistribuidos de un grupo a otro dependiendo de que centroide esté más cerca de la observación. Este procedimiento de calcular el centroide de cada cluster y re agrupar los objetos más cercanos a los centroides disponibles se repite de manera iterativa una cantidad fija de veces o hasta la convergencia del método (se considera que el método converge cuando una iteración no modifica la iteración anterior).

Más formalmente, sea un conjunto de observaciones $\{\vec{x}_1, \dots, \vec{x}_n\}$, k-means construye una partición de las observaciones en k grupos con $k \leq n$ a fin de minimizar una función de costo, como ser la suma de los cuadrados dentro de cada grupo $G = \{g_1, \dots, g_k\}$:

$$C = \underset{i=1}{\operatorname{argmin}} \sum_{i=1}^k \sum_{x_j \in g_i} \|x_j - \mu_i\|^2 \quad (3.16)$$

Con μ_i el valor medio de los elementos del grupo g_i . La figura 1.3 muestra un conjunto de observaciones y los grupos que se obtienen fijando $k = 2$ y $k = 5$, junto con sus respectivos centroides. Se observa que dependiendo del k utilizado, el algoritmo encuentra particiones con mayor o menor nivel de *resolución*. Volveremos sobre el tema de la resolución más adelante. [18, 19]

3.3.2. PAM

Si bien k-means es uno de los métodos de partición más utilizados ya que es muy eficiente en términos de tiempo computacional, el mismo es muy sensible a observaciones aisladas. Por esta razón, en algunos métodos se reemplazan los centroides, que son puntos no necesariamente pertenecientes al conjunto de observaciones, por medoides, que son los objetos más centrales dentro del grupo (se reemplaza k-means por k-medoids).

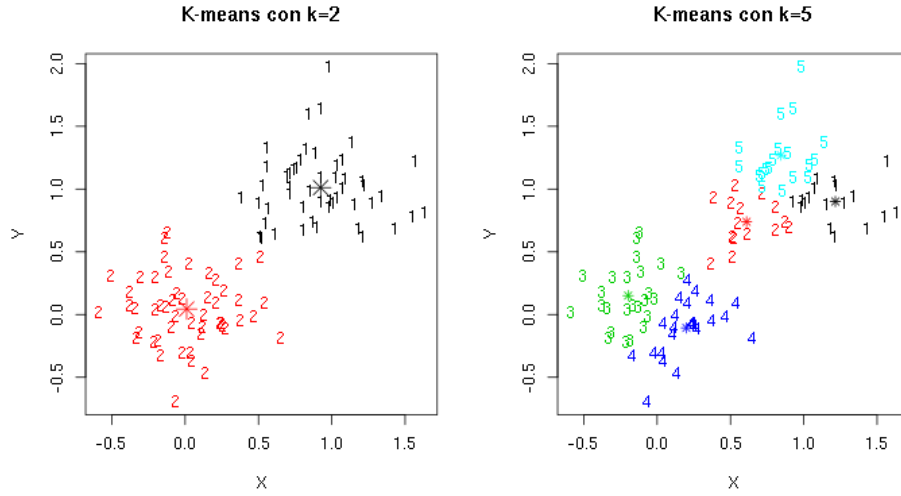


Figura 3.3: Agrupamiento utilizando k-means con $k = 2$ y $k = 5$. **mejorar epigrafe**

Esto hace que el método sea insensible a observaciones aisladas.

Particionar alrededor de medoides (Partitioning around medoids en inglés) es uno de los métodos más conocidos que hace uso de este concepto, buscando minimizar la función de costo:

$$C = \underset{i}{\operatorname{argmin}} \sum_{j=1}^k \sum_{x_j \in g_i} d(x_j, m_i) \quad (3.17)$$

Con m_i el medoide del grupo i y $d(x_j, m_i)$ la distancia entre el objeto x_j del grupo i y el medoide del mismo grupo. [20,21]

3.4. Agrupamientos jerárquicos

Existen dos acercamientos distintos para realizar un agrupamiento jerárquico: se puede ir “desde abajo hacia arriba”, agrupando grupos más chicos en grupos más grandes, lo que se conoce como agrupamiento aglomerativo, o se puede ir “desde arriba hacia abajo”, dividiendo grupos más grandes en grupos más chicos, lo que se conoce como agrupamiento divisivo. En este trabajo nos interesará únicamente trabajar con agrupamientos aglomerativos.

Un agrupamiento jerárquico aglomerativo comienza con cada objeto en un grupo separado. Luego, se unen los dos grupos más cercanos de acuerdo a algún criterio definido generando un nuevo grupo a partir de ambos. Al nuevo grupo se le asignará una distancia al resto de los grupos de acuerdo a cierto criterio. Esto se repite hasta que solo quede un único grupo.

Es un tipo de procedimiento determinista y voraz (greedy en inglés), ya que realiza las decisiones tomando en cuenta los óptimos locales en cada etapa, esperando obtener con esto un óptimo global.

Se dice que una partición es más fina (o un refinamiento) de otra partición, si cada grupo de una partición más fina está contenido dentro de un grupo de la partición más gruesa, es decir, cada grupo de la partición más fina es un sub-grupo de un grupo de la partición más gruesa. El agrupamiento jerárquico es un método cuyo resultado es un conjunto de particiones anidadas P_n, P_{n-1}, \dots, P_1 cada vez más gruesas, donde cada nivel más alto une dos grupos de una partición de un nivel más bajo.

Para poder realizar este procedimiento, es necesario definir cuan cercanos son dos grupos:

3.4.1. Método de Ward

Este método busca unir los grupos de una forma tal que se minimice la pérdida de información asociada a cada unión, usualmente cuantificada como el error de la suma de los cuadrados (ESS). Dado un conjunto de puntos C , el ESS asociado a C queda definido por:

$$ESS(C) = \sum_{\vec{x} \in C} (\vec{x} - \mu(C))(\vec{x} - \mu(C))^T \quad (3.18)$$

con $\mu(C) = \frac{1}{|C|} \sum_{\vec{x} \in C} \vec{x}$, el valor medio de C . Suponiendo que una dada partición está separada en k grupos, $\{C_1, C_2, \dots, C_k\}$, entonces se tiene que la pérdida de información de la partición está dada por:

$$ESS = \sum_{i=1}^k ESS(C_i) \quad (3.19)$$

En cada etapa de este método, se prueban todas las uniones de grupos posibles de a pares y se realiza aquella unión que minimiza 1.19.

En el agrupamiento jerárquico, el ESS comienza en cero, ya que cada punto pertenece a un grupo distinto, y crece a medida que se unen grupos. Al ser un algoritmo voraz, la ESS para un dado número de grupos k no será necesariamente la mínima.

3.4.2. Método de enlace único (o single-link en inglés)

Este método es uno de los métodos más simples para agrupamiento jerárquico. El mismo define la distancia entre dos grupos como la mínima distancia entre sus miembros. Sean C_i y C_j dos grupos, entonces la distancia de enlace único se define como:

$$D_{sl}(C_i, C_j) = \min_{\vec{x} \in C_i, \vec{y} \in C_j} d(\vec{x}, \vec{y}) \quad (3.20)$$

con $d(\vec{x}, \vec{y})$ la función de distancia utilizada para calcular la matriz de disimilaridad entre los elementos. El nombre de enlace único hace referencia a que dos grupos están cerca aunque tengan un único par de puntos cerca. Este método permite el manejo de grupos con formas complejas y es invariante ante transformaciones monótonas (como una transformación logarítmica) [22].

Este algoritmo solamente considera la separación entre elementos, dejando de lado la compacidad o el balance en los grupos.

3.4.3. Método de enlace completo (o complete-link en inglés)

Este método es similar al método de enlace único, ya que toma la distancia entre dos grupos como el máximo de la distancia entre sus puntos:

$$D_{cl}(C_i, C_j) = \max_{\vec{x} \in C_i, \vec{y} \in C_j} d(\vec{x}, \vec{y}) \quad (3.21)$$

con $d(\vec{x}, \vec{y})$ la función de distancia utilizada para calcular la matriz de disimilaridad entre los elementos.

En este trabajo, utilizaremos el método de enlace completo. [1, 22, 23]

3.4.4. Representación de un agrupamiento jerárquico - dendrogramas

Un agrupamiento jerárquico puede representarse como un árbol, llamado dendrograma, que permite una rápida interpretación. En un dendrograma, cada nodo está asociado con una altura h , tal que si A y B son dos nodos del dendrograma, h cumple:

$$h(A) \leq h(B) \Leftrightarrow A \subseteq B \quad (3.22)$$

A modo ilustrativo, la figura 1.4 muestra el agrupamiento jerárquico realizado sobre 10 puntos colocados de forma aleatoria en el plano, agrupados utilizando la distancia euclidiana y mediante los tres métodos vistos anteriormente (Ward, enlace único y enlace completo). De estos gráficos es claro que cada método produce una secuencia diferente de particiones, y dependerá de la aplicación que se requiera, cual de los métodos utilizar.

3.5. Detectando grupos en el agrupamiento jerárquico

El agrupamiento jerárquico organiza los objetos en árboles (dendrogramas) cuyas ramas son los grupos deseados. El proceso de detección de grupos se conoce como corte de árbol, corte de ramas o podado de ramas.

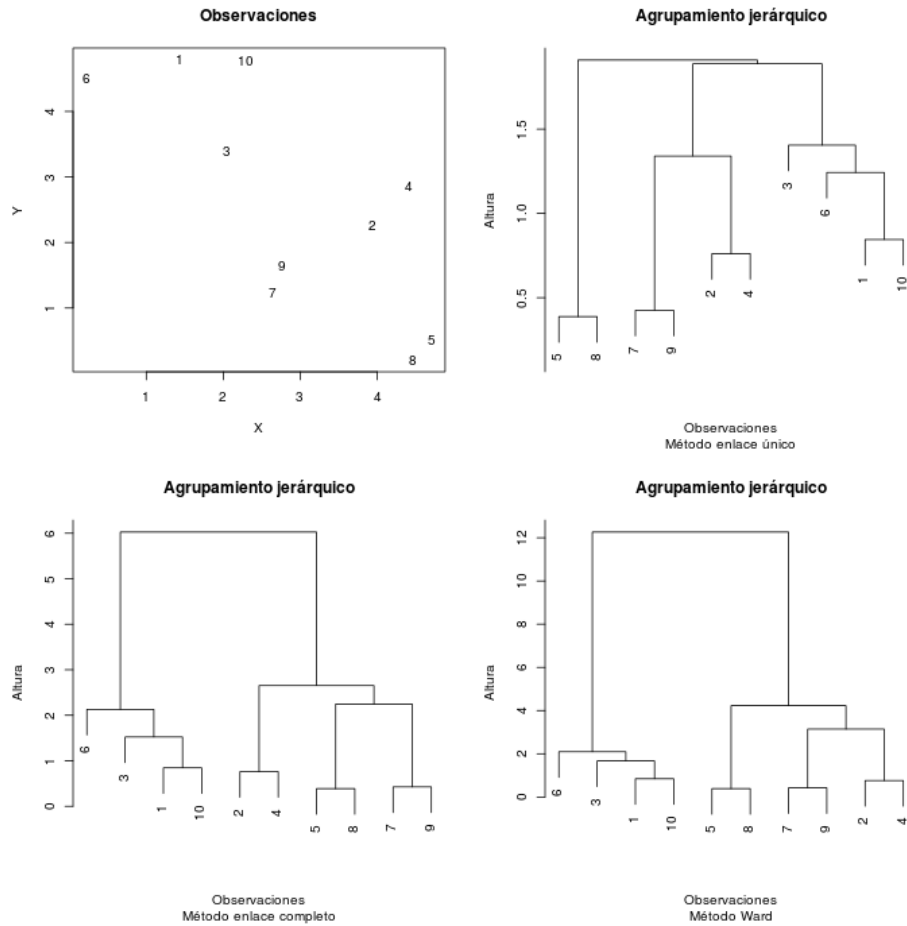


Figura 3.4: Ejemplos de agrupamientos jerárquicos utilizando el mismo conjunto de datos pero distintos métodos de distancia entre grupos. **mejorar epigrafe**

3.5.1. Corte de árbol estático

El método más sencillo de podado es conocido como corte de árbol estático, y funciona definiendo cada rama contigua debajo de una altura fija de corte, como un grupo separado. La cantidad de grupos obtenidos por éste método depende fuertemente de la altura de corte elegida. La figura 1.5 muestra dos alturas de corte posibles y los grupos que se obtienen a partir de cada una de ellas. Al cortar el árbol en $h = 3$, se obtienen dos grupos, el grupo g_1 , que contiene a las observaciones $\{6, 3, 1, 10\}$ y el grupo g_2 que contiene a las observaciones $\{2, 4, 8, 5, 7, 9\}$, mientras que al cortarlo en $h = 2$, se obtienen cuatro grupos, g'_1 con la observación $\{6\}$, g'_2 con las observaciones $\{3, 1, 10\}$, g'_3 con las observaciones $\{2, 4\}$ y g'_4 con las observaciones $\{5, 8, 7, 9\}$. A partir de un ejemplo tan sencillo es inmediato notar que el problema del agrupamiento es un problema “mal planteado”, es decir, cualquier conjunto de puntos puede ser

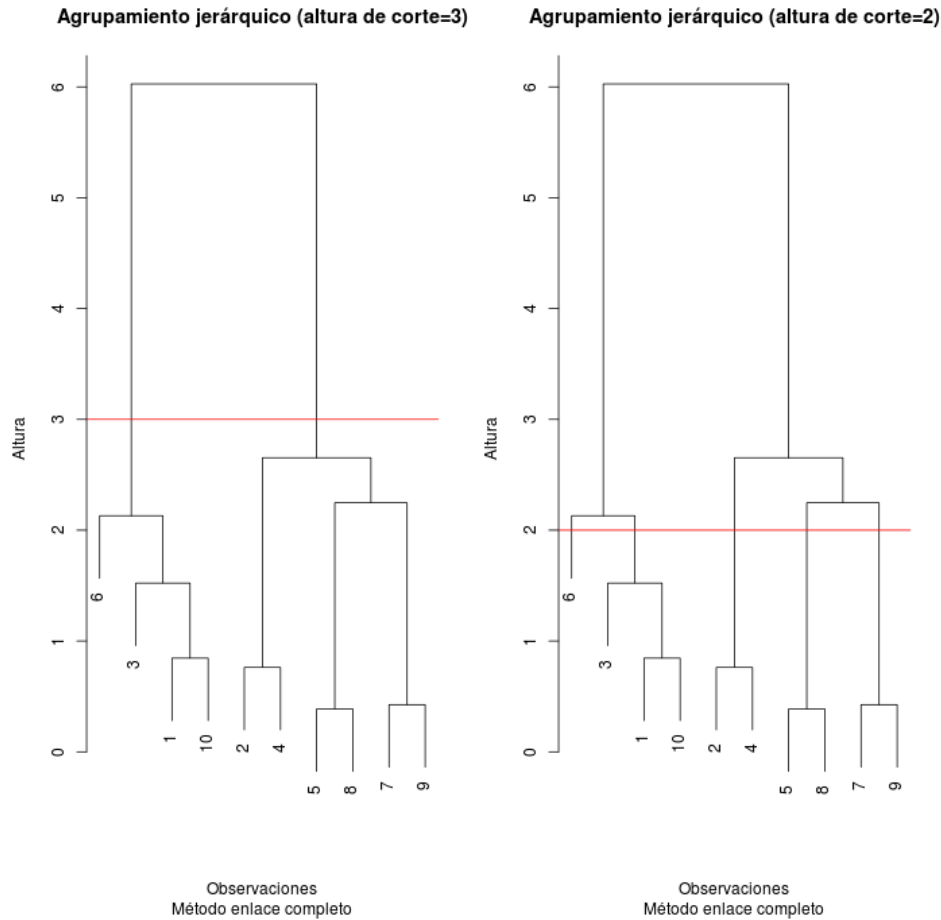


Figura 3.5: Corte de árbol a dos alturas diferentes. **mejorar epigrafe**

agrupado de maneras drásticamente distintas, sin que exista a priori un único criterio para preferir uno u otro agrupamiento. La fuente de ambigüedades a este respecto más importante, es que la forma en que los datos deberían ser agrupados, depende fuertemente de la *resolución* deseada. Lo que parece una única nube de puntos puede resultar ser, al analizar los datos con mayor resolución, una partición compuesta de muchos grupos. Cada tarea deberá encontrar el nivel adecuado de resolución para obtener la cantidad “correcta” de grupos. [3] [24]

3.5.2. Corte de árbol dinámico híbrido

Si bien es posible detectar grupos distintos en el dendrograma a partir de una inspección visual, utilizar una técnica de corte de árbol estático de forma programática no siempre logra identificar adecuadamente los grupos, ya que al poseer grupos anidados,

un solo corte a una altura prefijada no será capaz de detectarlos todos. El método de corte de árbol dinámico híbrido ataca este problema analizando la forma de las ramas del dendrograma en lugar de una altura absoluta [24]. El mismo construye los grupos de abajo hacia arriba en dos pasos. En el primer paso, se detectan las ramas que satisfacen un criterio específico para ser grupos. Este paso de poda está basado en la información de unión del dendrograma. En el segundo paso, se miden cuán cerca de los grupos detectados en el primer paso están todos los objetos no asignados previamente. Si un objeto está suficientemente cerca de un grupo, es asignado a ese grupo. En este paso, se ignora el dendrograma y se utiliza únicamente la información de disimilaridad. Este paso puede considerarse un método modificado de particionado alrededor de medoides (modified Partitioning Around Medoids o mPAM, en inglés). Por eso el nombre de *híbrido*, al tratarse de una mezcla entre agrupamiento jerárquico y no jerárquico. Los criterios específicos para la detección de grupos se basan en los siguientes cuatro criterios de la forma de las ramas:

1. Un grupo debe tener una cantidad mínima de objetos.
2. Los objetos que están muy lejos del grupo son excluidos del grupo aunque pertenezcan a la misma rama del dendrograma.
3. Cada grupo debe estar separado de su entorno por una brecha o espacio vacío.
4. El núcleo de cada grupo (el conjunto de objetos con menor altura de unión en el grupo) debe estar fuertemente conectado.

O más formalmente, dado un núcleo de un grupo, llamamos d al promedio de las disimilaridades de pares entre objetos del núcleo, es decir, a su dispersión y definimos la brecha g de un grupo como la diferencia entre d y la altura donde el grupo se une al resto del dendrograma y entonces, una rama se considera un grupo si:

1. Tiene al menos N_0 objetos.
2. Todas las alturas de unión son a lo sumo de h_{max} .
3. La brecha g del grupo es mayor que un g_{min} .
4. La dispersión d del núcleo es a lo sumo d_{max} .

Los parámetros N_0 , h_{max} , g_{min} y d_{max} son parámetros ajustables del método. La figura 1.6 muestra un ejemplo de los parámetros utilizados para definir los grupos en el paso 1.

Para el paso 2, de tipo PAM, los objetos no asignados (o aquellos grupos que no cumplan tener al menos N_0 objetos) son asignados al grupo más cercano si la disimilaridad correspondiente es más pequeña que una disimilaridad máxima definida previamente,

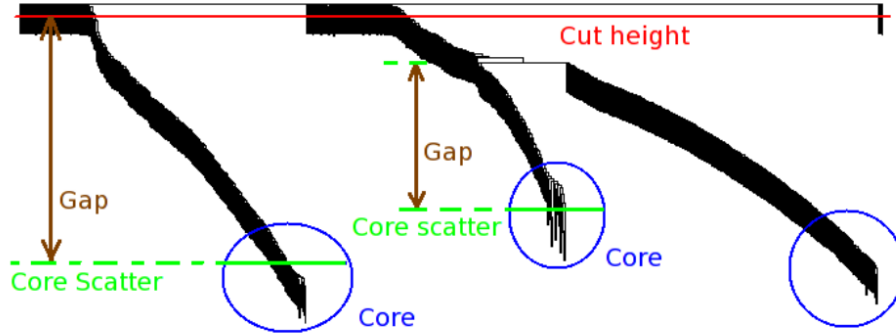


Figura 3.6: Dendrograma simulado con tres ramas con alturas de unión diferentes. La altura de corte corresponde a h_{max} (fuente: [24]). poner en castellano

o si es más pequeña que el “radio” del grupo. El “radio” se define como la máxima de las disimilaridades del medoide del grupo al resto de los objetos del mismo.

Es posible controlar la sensibilidad de las divisiones de los grupos mediante el parámetro *deepSplit*, que puede tomar los valores de 1 a 4. Para un *deepSplit* = 1, el método producirá relativamente pocos grupos, de muchos elementos y bien definidos, mientras que para *deepSplit* = 4, el método producirá más grupos pero con una dispersión mayor en el núcleo y separado por brechas más pequeñas.

Para una descripción más detallada del algoritmo, el lector interesado puede referirse a [24], [25].

3.6. Infomap y CNM

Como se desarrolló en la sección ??, las redes son construcciones útiles para esquematizar la organización de las interacciones en distintos tipos de sistemas. Sin embargo, por motivos de visualización, solo se pueden representar pequeños sistemas. Las redes reales son usualmente tan grandes que es necesario representarlas mediante algún mecanismo de granularidad más gruesa, es decir, descomponer a la red en módulos que representen varios nodos y arcos. Los módulos son conjuntos de módulos que tienen un alto solapamiento topológico. Este es el objetivo básico de lo que se conoce como *detección de comunidades*.

Una red puede representarse con una matriz de adjacencia $A = [a_{ij}]$ que codifica que pares de nodos están conectados. A es una matriz simétrica donde cada a_{ij} puede tomar un valor entre $[0, 1]$. Para una red no pesada, 0 indica que dos nodos no están conectados, mientras que 1 indica que si lo están. Para una red pesada, el elemento de matriz indica la fuerza de la conexión, tomando un valor entre $[0, 1]$.

A partir de la matriz de adjacencia, es posible construir una matriz de solapamiento

topológico $T = [t_{ij}]$ (TOM por sus siglas en inglés) que es una medida de similaridad para redes biológicas y está definida como:

$$t_{ij} = \begin{cases} \frac{l_{ij}+a_{ij}}{\min\{k_i, k_j\}+1-a_{ij}} & i \neq j \\ 1 & i = j \end{cases} \quad (3.23)$$

donde $l_{ij} = \sum_u a_{iu}a_{uj}$, $k_i = \sum_u a_{iu}$ y u es un índice que recorre todos los nodos de la red.

El solapamiento topológico de dos nodos refleja su similaridad en términos de los nodos en común que conectan. Básicamente, t_{ij} es un indicador del acuerdo entre el conjunto de nodos vecinos a i con el conjunto de nodos vecinos a j . Utilizando esta similaridad, se obtiene una matriz de disimilaridad $D = 1 - TOM$ y con esto es posible realizar agrupamientos utilizando, entre otras, alguna de las técnicas antes mencionadas. Además de TOM, es posible definir una matriz de solapamiento topológico generalizada de orden m , $T[m] = [t[m]_{ij}]$ (GTOMm), tal que mida el acuerdo entre los nodos que son accesibles por i y por j en m pasos. [26]

En este trabajo utilizaremos dos métodos de modularización en redes, Infomap [27] y CNM [28].

El método o algoritmo Infomap hace uso de criterios de optimización basados en teorías de información, donde los módulos se definen de tal forma que la longitud media de la descripción de un proceso de paseo al azar en el grafo sea mínima, mientras que el desarrollado por Clauset, Newman y Moore que denominaremos CNM, a partir de ciertas heurísticas, busca particiones de la red optimizando directamente una función de calidad Q .

Ambos métodos serán utilizados en este trabajo con el fin de comparar los resultados obtenidos para las comunidades Infomap y CNM con los obtenidos para los métodos de agrupamiento usados. [27, 29]

Capítulo 4

Análisis de dataset transcripcional Wiegel

4.1. Descripción del dataset

4.2. Métricas transcripcionales

4.3. Clustering

4.3.1. Proceso de filtrado y estandarización de datos

4.3.2. Clustering con k-means

4.3.3. Clustering con dynamic tree cut

4.3.4. Análisis de los métodos y problemas de escala de resolución

4.4. Coherencia entre la métrica transcripcional y otros espacios de conocimiento

idea esperamos que los conocimientos (entendidos como nociones de similitud) de los distintos espacios sean diferentes pero no ortogonales...cuantificación...veamos que estructuras son en cierto grado coherentes

4.4.1. Interacting densities

genex1 /genex4 VS BPa/BPb/CC PINinfomap / KEGGinfomap/LCI para referencia

4.4.2. Test de fisher

genex1 /genex4 VS BPa/BPb/CC

4.4.3. KTA y zKTA

Global KTA Genex por tratamiento + PIN + KEGG + LCI / GOBPa, GOBPb, GOCC zKTA: por tratamiento Gx/GOBPa, Gx/GOBPb, Gx/GOCC, Gx/PIN, Gx/LCI, Gx/Kegg

Capítulo 5

Métricas mixtas

Capítulo 6

conclusiones y perspectivas

Bibliografía

- [1] G. GAN *et al.* *Data Clustering: Theory, Algorithms, and Applications*, volume 20 (2007).
- [2] M. HALKIDI *et al.* *On clustering validation techniques.* Journal of Intelligent Information Systems **17** (2001) 107.
- [3] E. DOMANY. *Superparamagnetic clustering of data—the definitive solution of an ill-posed problem.* Physica A: Statistical Mechanics and its Applications **263** (1999) 158.
URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378437198004944>
- [4] S. CHEN *et al.* *On the similarity metric and the distance metric.* Theoretical Computer Science **410** (2009) 2365.
URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcs.2009.02.023>
- [5] L. W. KHENG. *Image Registration* (2010).
- [6] M. BABU. *An Introduction to Microarray Data Analysis.* Computational Genomics: Theory and Application (2004) 225.
URL <http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/genomes/madanm/microarray/chapter-final.pdf>
- [7] P. D’HAESELEER. *How does gene expression clustering work?* Nat Biotech **24** (2005).
- [8] C. HENNIG. *How to find an appropriate clustering for mixed-type variables with application to socio-economic stratification.* Journal of the Royal Statistical Society. Series C: Applied Statistics **62** (2013) 309.
- [9] M. EISEN. *Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95** (1998) 14863.
- [10] P. RESNIK. *Using Information Content to Evaluate Semantic Similarity in a Taxonomy.* roceedings of the 14th international joint conference on Artificial intelligence - Volume 1 - IJCAI’95 **1** (1995) 6.
URL <http://arxiv.org/abs/cmp-lg/9511007>

- [11] D. LIN. *An Information-Theoretic Definition of Similarity*. In: Proc. of the 15th International Conference on Machine Learning (1998) 296.
- [12] J. JIANG. *Semantic Similarity Based on Corpus Statistics and Lexical Taxonomy*. Proceedings of International Conference Research on Computational Linguistics (1997) 19.
- [13] C. PESQUITA *et al.* *Semantic similarity in biomedical ontologies*. PLoS Computational Biology **5** (2009).
- [14] B. BOSE. *In Vitro Differentiation of Pluripotent Stem Cells into Functional B Islets Under 2D and 3D Culture Conditions and In Vivo Preclinical Validation of 3D Islets*. Methods in Molecular Biology (2016) 257.
- [15] H. K. LEE *et al.* *Coexpression Analysis of Human Genes Across Many Microarray Data Sets* (2004) 1085.
- [16] J. SEVILLA. *Correlation between gene expression and go semantic similarity*. In: IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics (2005).
- [17] P. LORD. *Investigating semantic similarity measures across the Gene Ontology: the relationship between sequence and annotation*. Bioinformatics (2003).
- [18] J. KOGAN. *Introduction to Clustering Large and High-Dimensional Data* (2006).
- [19] J. HARTIGAN. *A K-Means Clustering Algorithm*. Journal of the Royal Statistical Society **28** (1979) 100.
- [20] H. S. PARK. *A simple and fast algorithm for K-medoids clustering*. Expert Systems with Applications **36** (2009) 3336.
- [21] L. IBRAHIM. *Using Modified Partitioning Around Medoids Clustering Technique in Mobile Network Planning* **9** (2012) 299.
- [22] J. STEPHEN. *Hierarchical clustering schemes*. Psychometrika (1967).
- [23] C. SHALIZI. *Distances between Clustering , Hierarchical Clustering*. Data Mining (2009) 36.
- [24] P. LANGFELDER *et al.* *Defining clusters from a hierarchical cluster tree: The Dynamic Tree Cut package for R*. Bioinformatics **24** (2008) 719.
- [25] P. LANGFELDER *et al.* *Dynamic Tree Cut : in-depth description , tests and applications* (2007) 1.

- [26] S. HORVATH. *The Generalized Topological Overlap Matrix For Detecting Modules in Gene Networks*. bioinformatics (2007).
- [27] M. ROSVALL. *Maps of random walks on complex networks reveal community structure*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **105** (2008) 1118.
- [28] A. CLAUSET *et al.* *Finding community structure in very large networks*. Phys. Rev. E **70** (2004) 66111.
URL <http://prola.aps.org/abstract/PRE/v70/i6/e066111>
- [29] A. BERENSTEIN. *Análisis de redes complejas en sistemas biomoleculares* (2014).