Laboratorio 5 Bioinformática: Análisis de Expresión Génica (2 Parte)

Manuel Villalobos Cid

21 de octubre de 2015

1. Introducción.

Incluso células que poseen el mismo ADN son diferentes entre sí debido a que presentan distinta expresión genónica. Este proceso es conocido como el **Dogma Central de la Biología Molecular**: un gen expresa su información por transcripción de ADN en ARN mensajero y es traducido a una proteína.

El estudio de expresión génica y análisis de mutaciones permite a los científicos comprender los mecanismos fisiopatológicos de las enfermedades para así determinar sus tratamientos. Esto se logra estableciendo diferencias de expresión entre muestras normales y patológicas. También ha sido utilizado para estudiar características poblacionales o determinar el efecto de medicamentos en células blanco.

Los microarreglos son una de las técnicas mas utilizadas para establecer perfiles de transcripción. Existen múltiples desarrollos comerciales y académicos que presentan características diversas en cobertura, disponibilidad, especificidad y sensibilidad. Los arreglos fabricados por *Affymetrix* son los mayormente utilizados. Sin embargo, también se emplean los construidos por *Agilent* o los de uso académico *CATMA*. Una de las principales fuentes de datos de microarreglos es ***Gene Expression Omnibus* de *NCBI* (GEO)**.

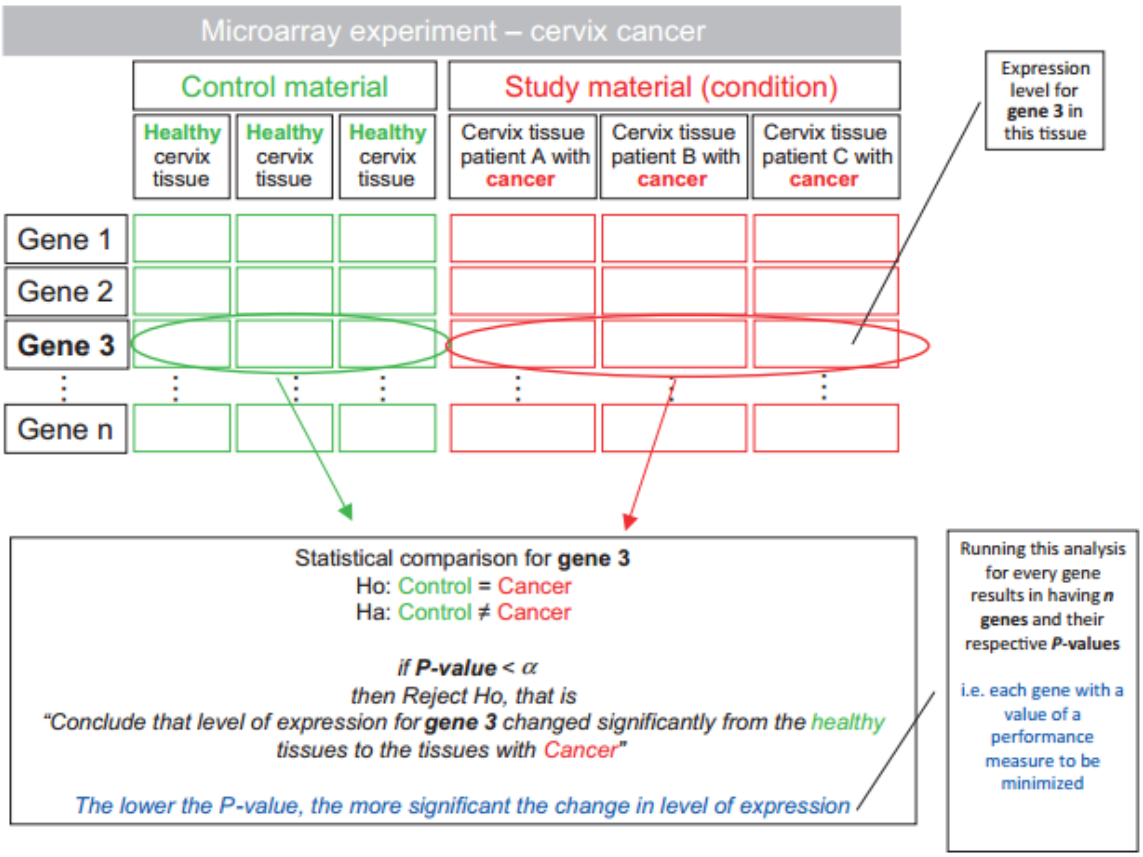


Figure 1.- Esquema de experimento para análisis de expresión génica con microarreglos.

Un juego de datos se caracteriza por tener una alta dimensionalidad: alrededor de 10.000 genes con más de 10 experimentos, además puede presentar ruido o deficiencias provenientes del proceso de hibridación. A raíz de este problema han surgido otras técnicas, como el Análisis en Serie de Expresión de Genes (Serial Analysis of Gene Expression, *SAGE*) o Firma Paralela de Secuenciación Masiva (Massively Parallel Signature Sequencing, *MPSS*). Ambas han demostrado ser mas robustas que el uso de microarreglos, ya que sus resultados no dependen de la selección de la sonda inicial. Recientemente se ha desarrollado una técnica denominada *RNA-seq*, cuyos resultados tampoco dependen de selección de sonda y no posee sesgo producido durante el proceso de hibridación. Sin embargo, aún no existe un conjunto de herramientas definitivas para procesar estos datos y el proceso de preparación de muestras continúa siendo bastante lento.

Para encontrar medidas de similaridad en expresión de genes se utiliza el concepto de distancia. Las más utilizadas corresponden a la Euclidiana y la correlación de *Pearson*. Sobre estas medidas se aplica minería de datos con métodos de clasificación y agrupamiento. Algoritmos basados en *UPGMA*, *NJ*, Mapas Auto-organizados (Self Organizing MAPS, *SOM*), lógica difusa, *SVM* y redes neuronales han sido ampliamente utilizados. Los algoritmos se pueden dividir en métodos planos, jerárquicos, basados en grafos, metaheurísticos y orientados a optimización. Éstos últimos pueden combinar varios de los grupos anteriores.

Esta guía de laboratorio tiene como objetivo que los alumnos se familiaricen con los conceptos relacionados con expresión génica, efectuando una pequeña experiencia en R, usando librerías disponibles por Bioconductor.

2. Actividades prácticas: diferenciación dos clases.

2.1 Gene Expression Omnibus: búsqueda, descarga y análisis de conjunto de datos

- Acceda a la base de datos de ***Gene Expression Omnibus* de *NCBI* (GEO)**.
- Puede buscar cualquier conjunto de datos utilizando el nombre de una determinada patología, publicación o identificador. Por ejemplo, buscar el conjunto de datos **GDS3709** y descargarlo haciendo click en **DataSet SOFT file**.
- Puede revisar los resultados ya obtenidos para los conjunto de datos, accediendo al **clustergrama** ubicado a la derecha de la pantalla. También puede utilizar las herramientas denominadas **Data Análisys Tools**.
- Investigue como funciona este juego de herramientas: **Data Análisys Tools**.

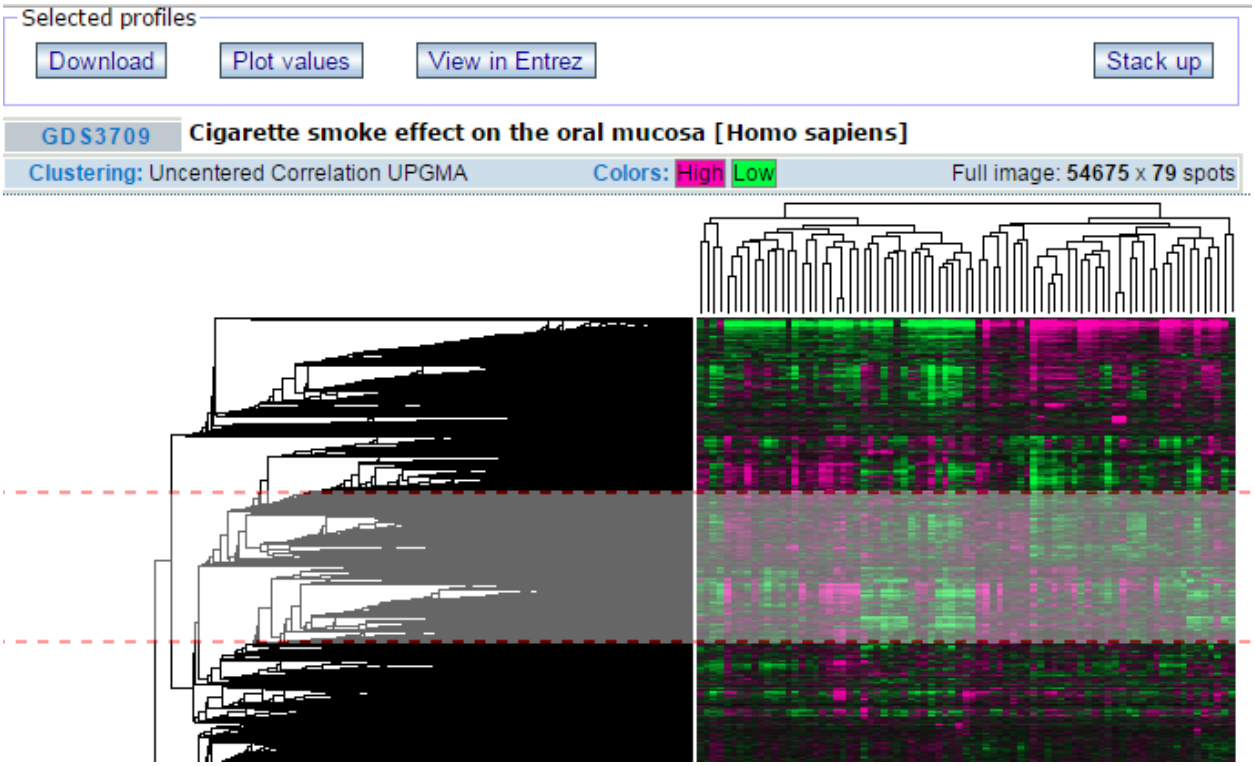


Figure 1.- Esquema de clustergrama realizado por GEO.

2.2 RStudio: Análisis de conjunto de datos

- Cree una carpeta, guarde su script y el conjunto de datos descargado.
- Para abrir los datos utilice el comando **getGEO** perteneciente a la librería **GEOquery**.

```
## Loading required package: BiocGenerics
## Loading required package: parallel
##
## Attaching package: 'BiocGenerics'
##
```

```
## The following objects are masked from 'package:parallel':
##
##     clusterApply, clusterApplyLB, clusterCall, clusterEvalQ,
##     clusterExport, clusterMap, parApply, parCapply, parLapply,
##     parLapplyLB, parRapply, parSapply, parSapplyLB
##
## The following object is masked from 'package:stats':
##
##     xtabs
##
## The following objects are masked from 'package:base':
##
##     anyDuplicated, append, as.data.frame, as.vector, cbind,
##     colnames, do.call, duplicated, eval, evalq, Filter, Find, get,
##     intersect, is.unsorted, lapply, Map, mapply, match, mget,
##     order, paste, pmax, pmax.int, pmin, pmin.int, Position, rank,
##     rbind, Reduce, rep.int, rownames, sapply, setdiff, sort,
##     table, tapply, union, unique, unlist, unsplit
##
## Welcome to Bioconductor
##
##     Vignettes contain introductory material; view with
##     'browseVignettes()'. To cite Bioconductor, see
##     'citation("Biobase")', and for packages 'citation("pkgname")'.
##
## Setting options('download.file.method.GEOquery'='auto')
```

- Averigue las características principales de su conjunto de datos utilizando los siguientes comandos.

```
Meta(datos)$channel_count
```

```
## [1] "1"
```

```
Meta(datos)$description
```

```
## [1] "Analysis of oral mucosae from 40 cigarette smokers and 40 age and gender matched never-smokers.
## [2] "female"
## [3] "male"
## [4] "cigarette smoke"
## [5] "control"
```

```
Meta(datos)$feature_count
```

```
## [1] "54675"
```

```
Meta(datos)$platform
```

```
## [1] "GPL570"
```

```
Meta(datos)$sample_count
```

```
## [1] "79"
```

```
Meta(datos)$sample_organism
```

```
## [1] "Homo sapiens"
```

```
Meta(datos)$sample_type
```

```
## [1] "RNA"
```

```
Meta(datos)$title
```

```
## [1] "Cigarette smoke effect on the oral mucosa"
```

```
Meta(datos)$type
```

```
## [1] "Expression profiling by array" "gender"
## [3] "gender"                        "agent"
## [5] "agent"
```

2.3 RStudio: conversión de datos a variables ordenadas.

- Para convertir los datos desde la estructura de Bioconductor a estructuras manejables directamente por R, se utiliza el comando **GDS2eset**

```
eset <- GDS2eSet(datos, do.log2=TRUE,GPL=NULL,AnnotGPL=FALSE)
```

```
## Warning in download.file(myurl, destfile, mode = mode, quiet = TRUE, method
## = getOption("download.file.method.GEOquery")): downloaded length 65236817 !
## = reported length 200
```

```
## File stored at:
## C:\Users\Manuel\AppData\Local\Temp\RtmpO6uaAB/GPL570.soft
```

- Revise la estructura de los datos llamando a la variable anterior.

```
eset
```

```
## ExpressionSet (storageMode: lockedEnvironment)
## assayData: 54675 features, 79 samples
##   element names: exprs
## protocolData: none
## phenoData
##   sampleNames: GSM447401 GSM447411 ... GSM447476 (79 total)
##   varLabels: sample gender agent description
```

```
##   varMetadata: labelDescription
## featureData
##   featureNames: 1007_s_at 1053_at ... AFFX-TrpnX-M_at (54675
##     total)
##   fvarLabels: ID GB_ACC ... Gene Ontology Molecular Function (16
##     total)
##   fvarMetadata: Column labelDescription
## experimentData: use 'experimentData(object)'
##   pubMedIds: 20179299
## Annotation:
```

- Conversión de datos a variables simples.

```
#----------------------------
#Matriz de Expresion
#----------------------------
mat_exp<-matrix(0, nrow = 54675, ncol = 79)
for(a in 1:54675)
  {for(b in 1:79)
    {mat_exp[a,b]<-exprs(eset)[a,b]
    }
}
print(mat_exp[1:10,1:5])
```

```
##            [,1]      [,2]     [,3]      [,4]      [,5]
##  [1,] 10.134426 10.224002 9.940754 10.070121 10.121534
##  [2,]  7.667466  7.503826 7.842979  7.325530  7.710806
##  [3,]  5.738768  5.797013 5.615887  5.289097  5.698774
##  [4,]  7.940167  7.710118 7.982423  7.802839  7.543032
##  [5,]  3.040542  3.023433 3.168963  2.921436  3.067467
##  [6,]  7.297375  7.226894 7.036723  6.996615  7.267723
##  [7,]  4.907371  4.985500 5.033423  5.178316  5.022812
##  [8,]  4.952799  4.955127 5.265662  5.067381  5.346957
##  [9,]  6.573496  6.368070 5.659354  5.172327  6.267161
## [10,]  6.352264  5.645010 5.815832  4.040892  6.259837
```

```
#----------------------------
#Probes
#----------------------------
probes<-featureData(eset)$"Gene Symbol"[1:54675]
print(probes[1:10])
```

```
##  [1] DDR1   RFC2   HSPA6  PAX8   GUCA1A UBA7   THRA   PTPN21 CCL5   CYP2E1
## 21050 Levels: ADAM32 AFG3L1P AKD1 ALG10 ARMCX4 ATP6V1E2 BEST4 ... FAM86B1
```

```
#----------------------------
#Muestras y clases
#----------------------------
 muestras<-0
 clase<-0
 for(a in 1:79)
 {muestras[a]<-sampleNames(phenoData(eset))[a]
```

```
#No fumadores
#Mujer
if ((phenoData(eset)$"agent"[a]=="control")&(phenoData(eset)$"gender"[a]=="female"))
{clase[a]=0}
#Hombre
if ((phenoData(eset)$"agent"[a]=="control")&(phenoData(eset)$"gender"[a]=="male"))
{clase[a]=1}
#Fumadores
#Mujer
if ((phenoData(eset)$"agent"[a]=="cigarette smoke")&(phenoData(eset)$"gender"[a]=="female"))
{clase[a]=2}
#Hombre
if ((phenoData(eset)$"agent"[a]=="cigarette smoke")&(phenoData(eset)$"gender"[a]=="male"))
{clase[a]=3}
}
print(muestras)
```

```
##  [1] "GSM447401" "GSM447411" "GSM447413" "GSM447415" "GSM447416"
##  [6] "GSM447425" "GSM447430" "GSM447435" "GSM447440" "GSM447444"
## [11] "GSM447448" "GSM447449" "GSM447450" "GSM447452" "GSM447458"
## [16] "GSM447461" "GSM447464" "GSM447468" "GSM447472" "GSM447400"
## [21] "GSM447402" "GSM447403" "GSM447405" "GSM447418" "GSM447422"
## [26] "GSM447424" "GSM447427" "GSM447428" "GSM447429" "GSM447431"
## [31] "GSM447432" "GSM447434" "GSM447442" "GSM447451" "GSM447462"
## [36] "GSM447463" "GSM447467" "GSM447469" "GSM447473" "GSM447404"
## [41] "GSM447406" "GSM447407" "GSM447409" "GSM447412" "GSM447426"
## [46] "GSM447433" "GSM447439" "GSM447441" "GSM447443" "GSM447445"
## [51] "GSM447446" "GSM447453" "GSM447455" "GSM447456" "GSM447459"
## [56] "GSM447466" "GSM447470" "GSM447474" "GSM447475" "GSM447398"
## [61] "GSM447399" "GSM447408" "GSM447410" "GSM447414" "GSM447417"
## [66] "GSM447419" "GSM447420" "GSM447421" "GSM447423" "GSM447436"
## [71] "GSM447437" "GSM447438" "GSM447447" "GSM447454" "GSM447457"
## [76] "GSM447460" "GSM447465" "GSM447471" "GSM447476"
```

```
print(clase)
```

```
##  [1] 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
## [36] 0 0 0 0 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
## [71] 1 1 1 1 1 1 1 1 1
```

```
pvalue<-0
c0 <- which(clase==1)
c1 <- which(clase==3)
clase2<-c(clase[c0],clase[c1])
clase2
```

```
##  [1] 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3
## [36] 3 3 3 3 3
```

```
#Eliminación de probes redudantes
lista<-which(probes!="")
```

```
probes<-probes[lista]
mat_exp<-mat_exp[lista,]

#Nivel de significancia
num_col<-length(c0)+length(c1)
mat_exp2<-matrix(0, nrow = length(lista), ncol = num_col)
for(a in 1:length(lista))
{mat_exp2[a,]=c(mat_exp[a,c0],mat_exp[a,c1])
  tabla<-data.frame(cbind(mat_exp2[a,],clase2))
  pvalue[a]<-kruskal.test(tabla[,1]~clase2,data=tabla)$p.value #Aplicación de KW
  }


#Ordenar matriz
 mat_exp2<-mat_exp2[order(pvalue),]
 probes<-probes[order(pvalue)]
 pvalue<-pvalue[order(pvalue)]
```

2.4 RStudio: gráfico de clustergrama.

Con objetivo de evaluar la existencia de diferencia de expresión, se construirá un clustergrama.

- Creación de paleta de clores

```
library(gplots)
```

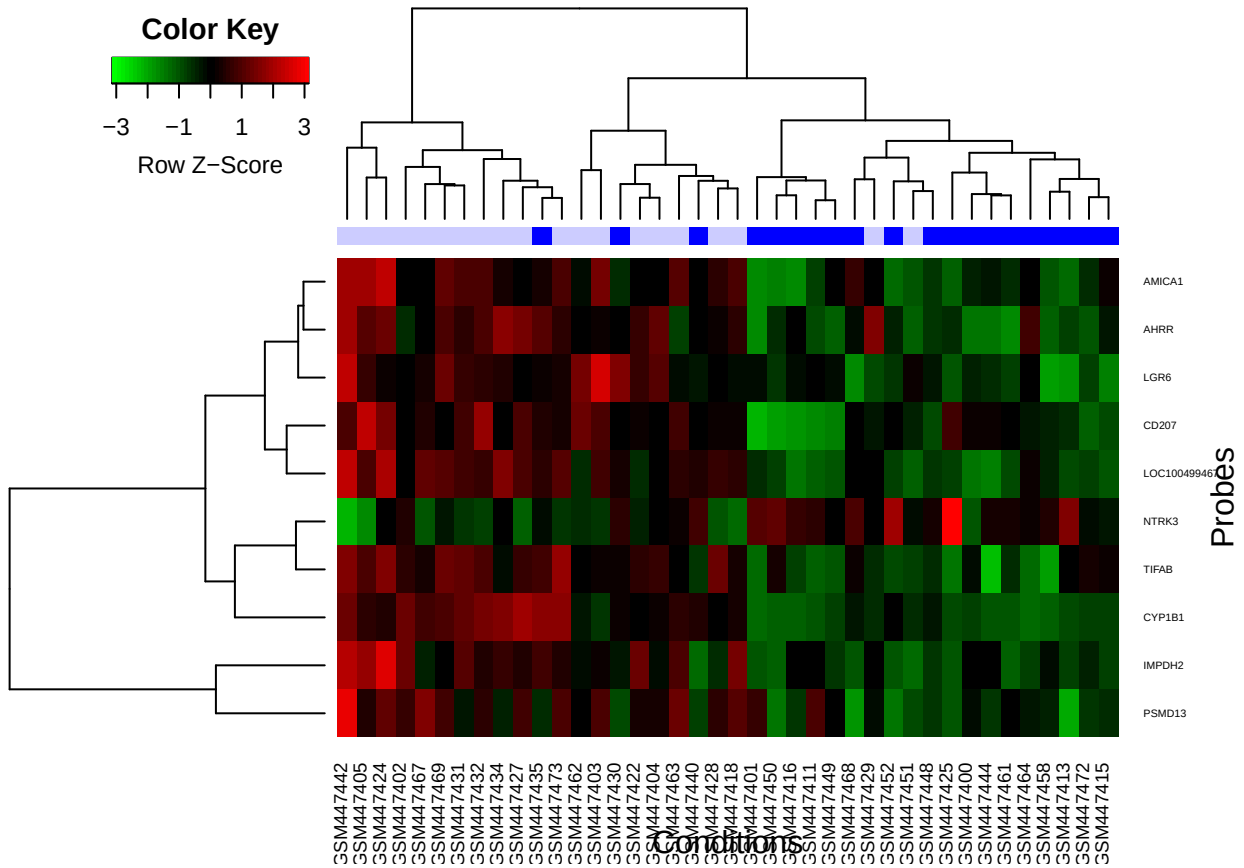
```
##
## Attaching package: 'gplots'
##
## The following object is masked from 'package:stats':
##
##     lowess
```

```
color.map <- function(clase2) { if (clase2=="0") "#FF0099" else {if (clase2=="1") "#0000FF" else {if (
patientcolors <- unlist(lapply(clase2, color.map))
patientcolors
```

```
##  [1] "#0000FF" "#0000FF" "#0000FF" "#0000FF" "#0000FF" "#0000FF" "#0000FF"
##  [8] "#0000FF" "#0000FF" "#0000FF" "#0000FF" "#0000FF" "#0000FF" "#0000FF"
## [15] "#0000FF" "#0000FF" "#0000FF" "#0000FF" "#0000FF" "#0000FF" "#CCCCFF"
## [22] "#CCCCFF" "#CCCCFF" "#CCCCFF" "#CCCCFF" "#CCCCFF" "#CCCCFF" "#CCCCFF"
## [29] "#CCCCFF" "#CCCCFF" "#CCCCFF" "#CCCCFF" "#CCCCFF" "#CCCCFF" "#CCCCFF"
## [36] "#CCCCFF" "#CCCCFF" "#CCCCFF" "#CCCCFF" "#CCCCFF"
```

- Creación de clustergrama (heatmap)

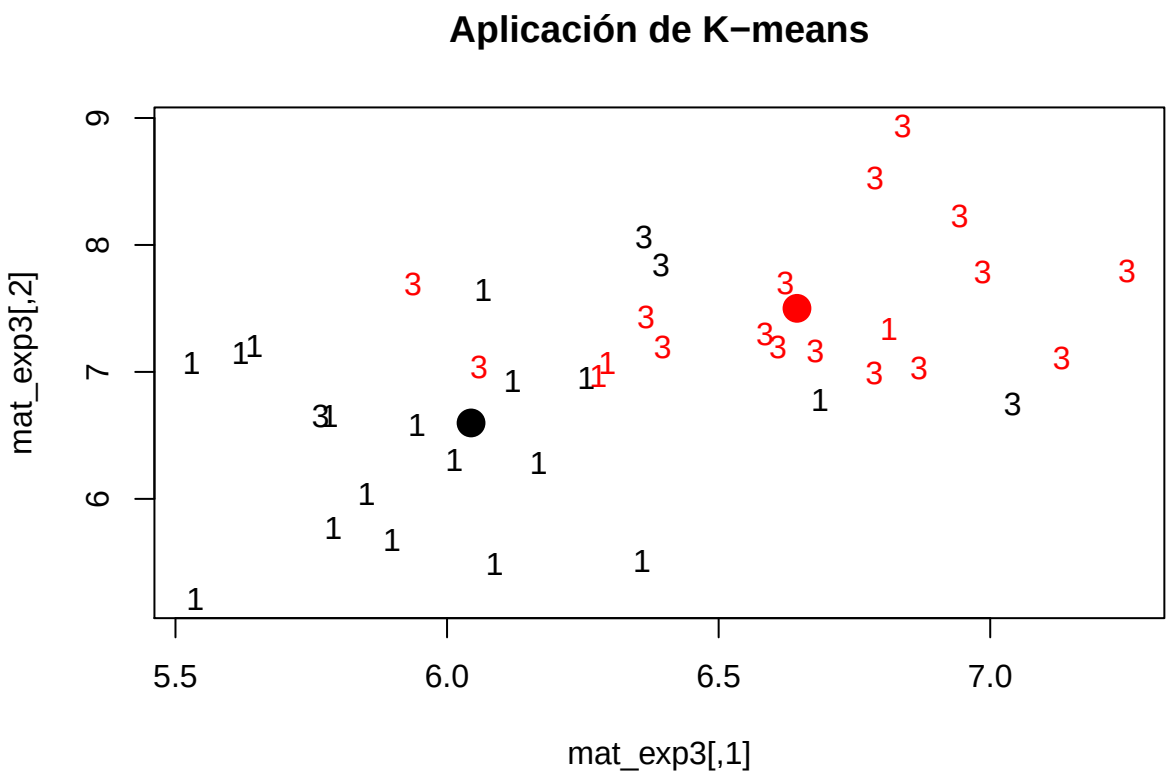
```
heatmap.2(mat_exp2[1:10,],col=greenred(50),xlab='Conditions',ylab='Probes',
          labRow=probes[1:10],ColSideColors=patientcolors, scale="row", key=TRUE,
          symkey=FALSE, density.info="none", trace="none", cexRow=0.5,
          distfun = function(x) dist(x,method = 'euclidean'),labCol=muestras,
          hclustfun = function(x) hclust(x,method = 'complete'))
```



2.5 RStudio: K-means

- Aplicación de K-means para evaluar capacidad de discriminación.

```
mat_exp3 <- t(mat_exp2[1:10,])[,nrow(mat_exp2[1:10,]):1]
cl <- kmeans(mat_exp3, 2)
grafico<-plot(mat_exp3, col = cl$cluster, type='n')
text(mat_exp3, labels=clase2, col=cl$cluster)
points(cl$centers, col = 1:2, pch = 16, cex = 2)
title(main="Aplicación de K-means")
```



3. Actividades prácticas: diferenciación multiclases.

. -Esta sección efectúa una comparación de todas las clases, utilizando métodos estadísticos multivariados. Se calculará Kruskall-Wallis sobre todas las clases. El valor p-value no estará ajustado, sin embargo servirá para efectuar un ordenamiento de las variables.

3.1 RStudio: conversión de datos a variables ordenadas

Se seguirá el procedimiento de la sección anterior, dejando una variable para cada clase. Para ello se efectuará lo siguiente:

```
library(pgirmess)
c0 <- which(clase==0)
c1 <- which(clase==1)
c2 <- which(clase==2)
c3 <- which(clase==3)

clase<-c(clase[c0],clase[c1],clase[c2],clase[c3])
num_col<-length(c0)+length(c2)+length(c2)+length(c3)
pvalue2<-0
for(a in 1:length(lista))
{mat_exp_t=c(mat_exp[a,c0],mat_exp[a,c1],mat_exp[a,c2],mat_exp[a,c3])
 tabla<-data.frame(cbind(mat_exp_t,clase))
```

```
 pvalue2[a]<-kruskal.test(tabla[,1]~clase,data=tabla)$p.value
}
```

- Ordenamiento según pvalue:

```
mat_exp<-mat_exp[order(pvalue2),]
probes<-probes[order(pvalue2)]
pvalue2<-pvalue[order(pvalue2)]
```

- ¿Cuántos genes son realmente significativos?

```
print(length(which(pvalue2<=0.05)))
```

```
## [1] 2712
```

- La función **kruskalmc** efectuará una comparación multivariada. Se observarán los primers 10 genes.

```
for(a in 1:10)
  {mat_exp_t=c(mat_exp[a,c0],mat_exp[a,c1],mat_exp[a,c2],mat_exp[a,c3])
   tabla<-data.frame(cbind(mat_exp_t,clase))
   print(kruskalmc(tabla[,1]~clase,data=tabla))
  }
```

```
## Multiple comparison test after Kruskal-Wallis
## p.value: 0.05
## Comparisons
##     obs.dif critical.dif difference
## 0-1   2.750     19.14631      FALSE
## 0-2  39.100     19.39660       TRUE
## 0-3  33.575     19.14631       TRUE
## 1-2  36.350     19.39660       TRUE
## 1-3  30.825     19.14631       TRUE
## 2-3   5.525     19.39660      FALSE
## Multiple comparison test after Kruskal-Wallis
## p.value: 0.05
## Comparisons
##       obs.dif critical.dif difference
## 0-1 31.150000     19.14631       TRUE
## 0-2  3.626316     19.39660      FALSE
## 0-3 35.100000     19.14631       TRUE
## 1-2 34.776316     19.39660       TRUE
## 1-3  3.950000     19.14631      FALSE
## 2-3 38.726316     19.39660       TRUE
## Multiple comparison test after Kruskal-Wallis
## p.value: 0.05
## Comparisons
##      obs.dif critical.dif difference
## 0-1  2.57500     19.14631      FALSE
## 0-2 37.84868     19.39660       TRUE
## 0-3 27.35000     19.14631       TRUE
## 1-2 40.42368     19.39660       TRUE
```

```
## 1-3 29.92500     19.14631       TRUE
## 2-3 10.49868     19.39660      FALSE
## Multiple comparison test after Kruskal-Wallis
## p.value: 0.05
## Comparisons
##       obs.dif critical.dif difference
## 0-1 32.925000     19.14631       TRUE
## 0-2  2.009211     19.39660      FALSE
## 0-3 37.550000     19.14631       TRUE
## 1-2 30.915789     19.39660       TRUE
## 1-3  4.625000     19.14631      FALSE
## 2-3 35.540789     19.39660       TRUE
## Multiple comparison test after Kruskal-Wallis
## p.value: 0.05
## Comparisons
##       obs.dif critical.dif difference
## 0-1 31.150000     19.14631       TRUE
## 0-2  6.068421     19.39660      FALSE
## 0-3 31.100000     19.14631       TRUE
## 1-2 37.218421     19.39660       TRUE
## 1-3  0.050000     19.14631      FALSE
## 2-3 37.168421     19.39660       TRUE
## Multiple comparison test after Kruskal-Wallis
## p.value: 0.05
## Comparisons
##       obs.dif critical.dif difference
## 0-1 29.875000     19.14631       TRUE
## 0-2  2.363158     19.39660      FALSE
## 0-3 39.375000     19.14631       TRUE
## 1-2 27.511842     19.39660       TRUE
## 1-3  9.500000     19.14631      FALSE
## 2-3 37.011842     19.39660       TRUE
## Multiple comparison test after Kruskal-Wallis
## p.value: 0.05
## Comparisons
##       obs.dif critical.dif difference
## 0-1 35.500000     19.14631       TRUE
## 0-2  3.118421     19.39660      FALSE
## 0-3 35.600000     19.14631       TRUE
## 1-2 32.381579     19.39660       TRUE
## 1-3  0.100000     19.14631      FALSE
## 2-3 32.481579     19.39660       TRUE
## Multiple comparison test after Kruskal-Wallis
## p.value: 0.05
## Comparisons
##       obs.dif critical.dif difference
## 0-1  2.600000     19.14631      FALSE
## 0-2 39.023684     19.39660       TRUE
## 0-3 29.650000     19.14631       TRUE
## 1-2 36.423684     19.39660       TRUE
## 1-3 27.050000     19.14631       TRUE
## 2-3  9.373684     19.39660      FALSE
## Multiple comparison test after Kruskal-Wallis
## p.value: 0.05
```

```
## Comparisons
##        obs.dif critical.dif difference
## 0-1 34.3500000     19.14631       TRUE
## 0-2  0.2578947     19.39660      FALSE
## 0-3 32.9500000     19.14631       TRUE
## 1-2 34.0921053     19.39660       TRUE
## 1-3  1.4000000     19.14631      FALSE
## 2-3 32.6921053     19.39660       TRUE
## Multiple comparison test after Kruskal-Wallis
## p.value: 0.05
## Comparisons
##       obs.dif critical.dif difference
## 0-1 36.100000     19.14631       TRUE
## 0-2  6.426316     19.39660      FALSE
## 0-3 36.400000     19.14631       TRUE
## 1-2 29.673684     19.39660       TRUE
## 1-3  0.300000     19.14631      FALSE
## 2-3 29.973684     19.39660       TRUE
```

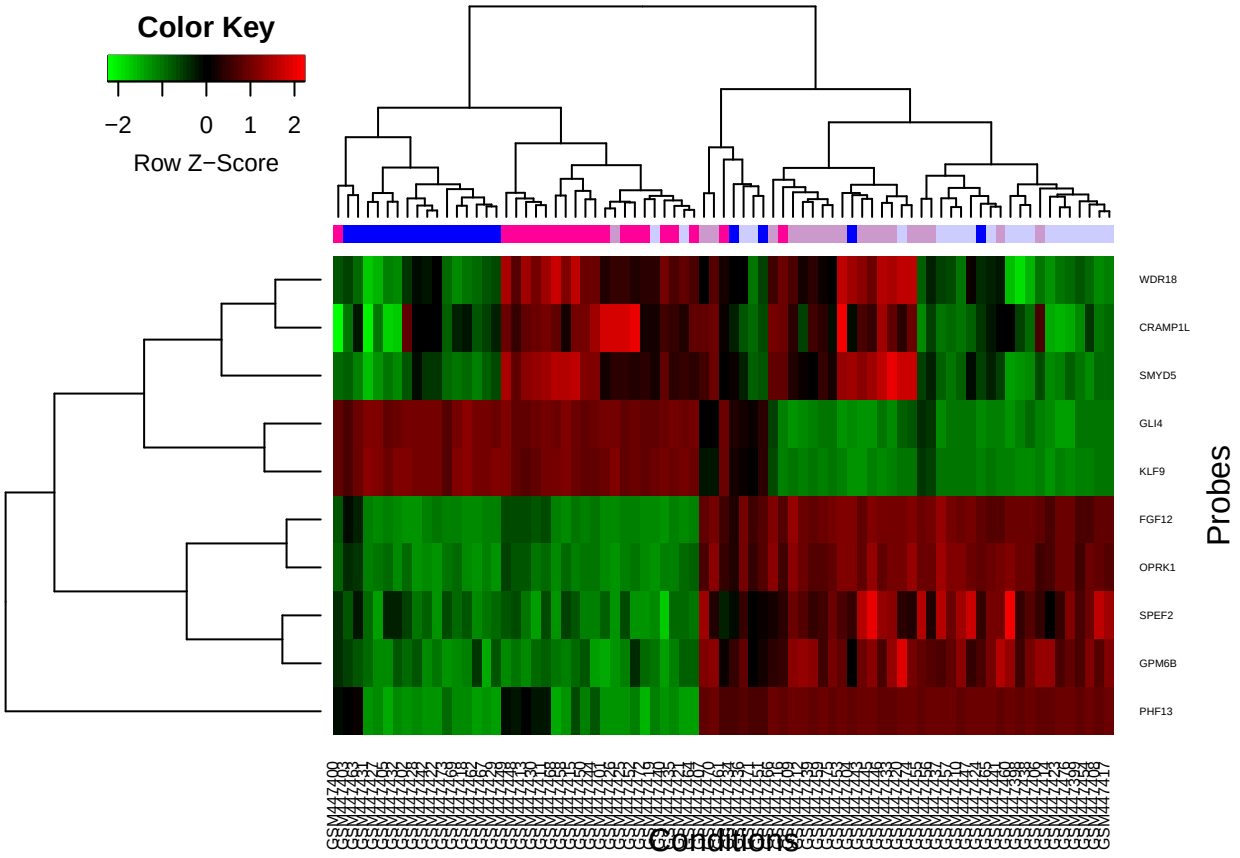
```
library(gplots)
color.map <- function(clase) { if (clase=="0") "#FF0099" else {if (clase=="1") "#0000FF" else {if (clase
patientcolors <- unlist(lapply(clase, color.map))
patientcolors
```

```
##  [1] "#FF0099" "#FF0099" "#FF0099" "#FF0099" "#FF0099" "#FF0099" "#FF0099"
##  [8] "#FF0099" "#FF0099" "#FF0099" "#FF0099" "#FF0099" "#FF0099" "#FF0099"
## [15] "#FF0099" "#FF0099" "#FF0099" "#FF0099" "#FF0099" "#FF0099" "#0000FF"
## [22] "#0000FF" "#0000FF" "#0000FF" "#0000FF" "#0000FF" "#0000FF" "#0000FF"
## [29] "#0000FF" "#0000FF" "#0000FF" "#0000FF" "#0000FF" "#0000FF" "#0000FF"
## [36] "#0000FF" "#0000FF" "#0000FF" "#0000FF" "#0000FF" "#CC99CC" "#CC99CC"
## [43] "#CC99CC" "#CC99CC" "#CC99CC" "#CC99CC" "#CC99CC" "#CC99CC" "#CC99CC"
## [50] "#CC99CC" "#CC99CC" "#CC99CC" "#CC99CC" "#CC99CC" "#CC99CC" "#CC99CC"
## [57] "#CC99CC" "#CC99CC" "#CC99CC" "#CCCCFF" "#CCCCFF" "#CCCCFF" "#CCCCFF"
## [64] "#CCCCFF" "#CCCCFF" "#CCCCFF" "#CCCCFF" "#CCCCFF" "#CCCCFF" "#CCCCFF"
## [71] "#CCCCFF" "#CCCCFF" "#CCCCFF" "#CCCCFF" "#CCCCFF" "#CCCCFF" "#CCCCFF"
## [78] "#CCCCFF" "#CCCCFF"
```

3.2 RStudio: gráfico de clustergrama.

El clustergrama se construirá usando el mismo procedimiento de la sección anterior.

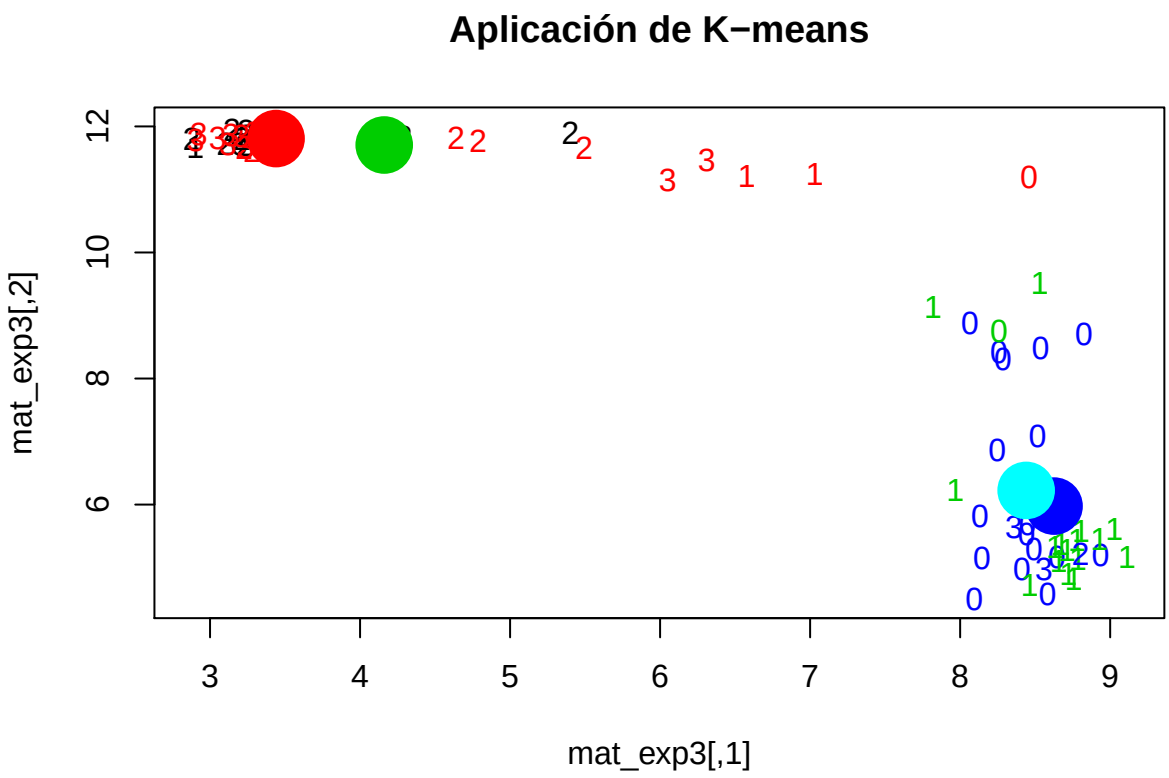
```
heatmap.2(mat_exp[1:10,],col=greenred(50),xlab='Conditions',ylab='Probes',
          labRow=probes[1:10],ColSideColors=patientcolors, scale="row", key=TRUE,
          symkey=FALSE, density.info="none", trace="none", cexRow=0.5,
          distfun = function(x) dist(x,method = 'euclidean'),labCol=muestras,
          hclustfun = function(x) hclust(x,method = 'complete'))
```



3.3 RStudio: K-means

- Aplicación de K-means para evaluar capacidad de discriminación.

```
mat_exp3 <- t(mat_exp[1:10,])[,nrow(mat_exp[1:10,]):1]
cl <- kmeans(mat_exp3, 4)
grafico<-plot(mat_exp3, col = cl$cluster, type='n')
text(mat_exp3, labels=clase, col=cl$cluster)
points(cl$centers, col = 2:5, pch = 16, cex = 4)
title(main="Aplicación de K-means")
```


Aplicación de K−means
mat_exp3[,2]
mat_exp3[,1]
12
10
8
6
3
4
5
6
7
8
9