



UNIVERSIDAD
DE GRANADA

Facultad de Ciencias

E.T.S. Ingenierías Informática y de Telecomunicación

DOBLE GRADO EN INGENIERÍA INFORMÁTICA Y
MATEMÁTICAS

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Metodologías Multivariantes para la Identificación de Patrones Biológicos

Presentado por:

Quintín Mesa Romero

Curso académico 20242025

Metodologías Multivariantes para la Identificación de Patrones Biológicos

Quintín Mesa Romero

Quintín Mesa Romero *Metodologías Multivariantes para la Identificación de Patrones Biológicos.*

Trabajo de fin de Grado. Curso académico 20242025.

**Responsable de
tutorización**

José Luis Romero Béjar
*Departamento de Estadística e
Investigación Operativa*

Doble Grado en
Ingeniería Informática y
Matemáticas

Facultad de Ciencias
E.T.S. Ingenierías
Informática y de
Telecomunicación

Universidad de Granada

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

D./Dña. Quintín Mesa Romero

Declaro explícitamente que el trabajo presentado como Trabajo de Fin de Grado (TFG), correspondiente al curso académico 20242025, es original, entendido esto en el sentido de que no he utilizado para la elaboración del trabajo fuentes sin citarlas debidamente.

En Granada a March 30, 2025

Fdo: Quintín Mesa Romero

1 Introducción

La biología, como disciplina científica, ha experimentado una evolución notable en las últimas décadas, pasando de enfoques cualitativos y descriptivos a un análisis más detallado y cuantitativo de los organismos vivos. Este cambio de paradigma se produjo a mediados del siglo XX con la llegada de la *biología molecular*, tras casi dos siglos de preeminencia del naturalismo basado en la observación y la contemplación. Este avance marcó el inicio de una nueva era en la que el desarrollo de ciertas herramientas tecnológicas permitió analizar los diversos y complejos niveles de organización de los organismos, generando grandes volúmenes de datos en periodos relativamente cortos: la *era de las ciencias ómicas*[1][2].

En este contexto, las ciencias ómicas surgieron como un marco integrador que engloba el conocimiento derivado de la aplicación de tecnologías avanzadas para el estudio a nivel molecular de los distintos elementos que conforman los sistemas biológicos, como células, tejidos e individuos. Estas disciplinas no solo permiten analizar la complejidad interna de los organismos, sino también comprender las interacciones dinámicas entre sus componentes internos y los factores externos con los que estos interactúan. Ofrecen, en definitiva, una perspectiva holística del individuo, proporcionando una visión detallada del funcionamiento de sus células y de la influencia del entorno que las rodea[2].

El término *ómica* fue acuñado en la década de 1980 para referirse al estudio de *conjuntos de moléculas* específicas, como genes (genómica), transcripciones de ARN (transcriptómica), proteínas (proteómica) o metabolitos (metabolómica), entre otros. Estas disciplinas han evolucionado significativamente gracias a los avances tecnológicos que permiten abordar la complejidad inherente de los sistemas biológicos analizados. De hecho, este es el máximo distintivo de las ciencias ómicas: el uso de las llamadas *tecnologías ómicas*, herramientas de alto rendimiento diseñadas para generar grandes cantidades de datos en un solo experimento a partir de una única muestra. Este enfoque masivo en la obtención de datos, conocido como *Big Data*, ha transformado profundamente el análisis biológico, permitiendo explorar dinámicas moleculares con un gran nivel de detalle.[2][3]

La integración de las ciencias ómicas con metodologías avanzadas de análisis, como las técnicas multivariantes y el aprendizaje automático, ha marcado un hito en la investigación biomédica, abriendo nuevas fronteras en la comprensión de los complejos sistemas biológicos. Estas metodologías, que permiten gestionar y analizar grandes volúmenes de datos con múltiples dimensiones, son fundamentales para descubrir patrones biológicos subyacentes que, de otro modo, podrían pasar desapercibidos

utilizando métodos tradicionales[4]. Técnicas multivariantes, como el análisis de componentes principales (PCA), el análisis clúster, el análisis factorial o el análisis discriminante, facilitan la identificación de relaciones y la reducción de la dimensionalidad en los datos, lo que es crucial para poder extraer información relevante de los voluminosos conjuntos de datos generados[5].

A medida que los volúmenes de datos generados por las tecnologías ómicas se incrementan, la *bioinformática* se ha consolidado como una disciplina esencial para procesar, gestionar y analizar dichos datos[6]. Facilita la identificación y visualización de patrones biológicos complejos a partir de grandes bases de datos, mediante el uso de algoritmos avanzados, herramientas computacionales y modelos estadísticos. Este enfoque es fundamental para descubrir asociaciones moleculares, determinar biomarcadores relevantes y comprender las bases genéticas de enfermedades[7]. En este sentido, las herramientas bioinformáticas, como los lenguajes de programación R y Python, entre otros, junto con plataformas especializadas como Bioconductor, permiten realizar análisis profundos de datos ómicos a gran escala, proporcionando los recursos necesarios para un manejo efectivo y preciso de la información biológica[8].

Además, la combinación de las ciencias ómicas con estas metodologías avanzadas ha mejorado significativamente nuestra comprensión de los procesos biológicos y ha facilitado el desarrollo de estrategias diagnósticas y terapéuticas innovadoras. En particular, las técnicas multivariantes y el aprendizaje automático han demostrado ser esenciales para la identificación de patrones biológicos en diversas enfermedades, desde el cáncer hasta trastornos neurodegenerativos, así como para predecir la respuesta a distintos tratamientos. Esta integración ha impulsado el avance hacia la medicina personalizada y de precisión, en la que los tratamientos se ajustan a las características individuales de cada paciente, haciéndolos mucho más eficientes y reduciendo efectos adversos.

En el presente trabajo, se explorará el uso de la transcriptómica, como ciencia ómica y las metodologías avanzadas de análisis de datos, como las técnicas multivariantes y el aprendizaje automático, para la identificación y clasificación de ciertos patrones biológicos. Se realizará una revisión teórica de las técnicas multivariantes más comunes, anteriormente mencionadas, aunque nos centraremos en una de ellas con el fin de proporcionar una base sólida para su aplicación práctica en datos ómicos. Posteriormente, se llevará a cabo una implementación realista y funcional para el análisis de datos biológicos, aplicando técnicas de aprendizaje automático para la identificación de patrones biológicos significativos. A través de estas metodologías avanzadas, se intentará simplificar los datos ómicos para poder extraer la información clave que permita clasificar y entender mejor los patrones biológicos, mejorando así la precisión de los modelos predictivos.

Parte I

DATOS ÓMICOS

2 Datos ómicos

A la información cuantitativa y cualitativa obtenida a partir de las tecnologías utilizadas en las distintas ciencias ómicas, se le denomina *datos ómicos*. Estos datos abarcan información genética (genómica), de expresión génica (transcriptómica), de proteínas (proteómica), metabolitos (metabolómica) y otras áreas emergentes dentro de las ciencias ómicas.

Una de sus características más relevantes es su *alta dimensionalidad*, lo que genera conjuntos de datos masivos y complejos. Esta naturaleza multidimensional y heterogénea de los datos ómicos presenta desafíos significativos en su procesamiento, análisis e interpretación.

En este capítulo, se presenta la estructura de los datos ómicos, destacando su naturaleza matricial en la que el número de características (variables) suele superar ampliamente el número de muestras. Se analiza el desafío estadístico que representan los datos de alta dimensión y se introduce el problema de la expresión diferencial. Además, se aborda la transcriptómica y las tecnologías de secuenciación de ARN (RNA-seq y scRNA-seq), describiendo la estructura de los datos que generan y los retos asociados a su manejo, dado su gran volumen y alta dimensionalidad.

La información presentada en las próximas dos secciones ha sido extraída de la fuente bibliográfica[9].

2.1 Estructura de los datos

Los datos con los que trabajaremos se caracterizan por tener una estructura parecida. Analizaremos un conjunto con pocas muestras frente al gran número de características que observaremos sobre ellas. Apreciamos aquí el carácter de alta dimensionalidad de los datos ómicos.

Las características que analizamos pueden ser de diferentes tipos, como el nivel de fluorescencia, en el caso de que estemos trabajando con microarrays ¹, como los de ADN, metilación o proteínas, o el número de lecturas alineadas obtenidas en procedimientos de secuenciación. Estas características, pueden estar asociadas a un elemento de análisis o a un conjunto de muestras en un microarray. O bien, la información puede corresponder a un gen, un exón ², una proteína o una región específica del genoma.

¹Microarray: La tecnología de microarrays permite estudiar la expresión de múltiples genes simultáneamente. Consiste en fijar miles de secuencias génicas en un chip de vidrio. Al exponer una muestra de ADN o ARN, el apareamiento de bases complementarias genera una señal luminosa medible, indicando los genes expresados en la muestra[10].

²Exón: un exón es una región del genoma que termina dentro de una molécula de ARN mensajero. Algunos exones son codificantes, es decir, contienen información para fabricar una proteína, mientras

Denotaremos por N al número de características observadas, que será un valor relativamente grande, del orden de miles. Como hemos mencionado anteriormente, estas características se observan sobre un conjunto reducido de individuos, del orden de las decenas, en el mejor de los casos. Sea entonces n el número de muestras sobre las que serán observadas las variables (características).

Por consiguiente, el problema se enmarca dentro del campo de la estadística de alta dimensión. Esta situación, donde N supera a n , contrasta con lo que se observa en los enfoques estadísticos convencionales, en los cuales suele ocurrir todo lo contrario: el número de muestras es mayor que el de variables. Aunque esta desigualdad presenta limitaciones, también abre un nuevo campo de investigación con retos que los métodos tradicionales no pueden resolver, lo que motiva el desarrollo de nuevos procedimientos que se explorarán más adelante.

Las características las almacenaremos en una matriz, que llamaremos *matriz de expresión*, dada por:

$$x = [x_{ij}]_{i=1,\dots,N, j=1,\dots,n} = \begin{bmatrix} x_{11} & x_{12} & \cdots & x_{1n} \\ x_{21} & x_{22} & \cdots & x_{2n} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ x_{N1} & x_{N2} & \cdots & x_{Nn} \end{bmatrix}$$

donde x_{ij} cuantifica la característica i en la muestra j .

Nota. Observemos que en un contexto estadístico convencional, la matriz de datos sería la matriz transpuesta de la que vamos a estar utilizando.

En el supuesto de que x_{ij} esté asociado con un microarray de ADN, entonces, mide un nivel de fluorescencia, tomando valores positivos, aunque pudiera ser que, tras el procesamiento de los datos, se diera lugar a expresiones negativas. Por su parte, si se tratase de un dato obtenido mediante la técnica de secuenciación RNA-seq, que será introducida a continuación, tendríamos conteos; número de lecturas cortas que se alinean sobre un gen, exón o una zona genómica concretos. Un mayor número de lecturas será indicativo de una mayor expresión de dicha característica.

Los valores observados de una característica sobre el conjunto de todas las muestras (una fila de la matriz de expresión) son, en el ámbito de la transcriptómica, lo que se conoce como *perfil*, o de forma más general, perfil de expresión.

En la matriz x los valores correspondientes a las diferentes muestras son indepen-

que otros son no codificantes. Los genes del genoma están formados por exones e intrones, que son trozos muy grandes de ARN dentro de una molécula de ARN mensajero que interfieren con el código de los exones. Estos intrones se eliminan de la molécula de ARN para dejar una serie de exones unidos entre sí de manera que se puedan codificar los aminoácidos correctos[11][12].

dientes entre sí, aunque pueden haber sido obtenidos bajo condiciones distintas. Por lo tanto, no se trata de réplicas de una misma condición experimental, sino de observaciones independientes. Es decir, presentan independencia condicional. Sin embargo, las filas de x representan vectores que sí están relacionados. Por ejemplo, en una matriz de expresión génica⁵, los valores de expresión de las filas no son independientes, debido a que los genes tienden a actuar de manera coordinada.

Por lo general, los datos en las columnas de la matriz x , no pueden compararse directamente entre sí, por la presencia de diversos artefactos técnicos y ruido en la medición de la característica de interés. Es por ello que se han desarrollado técnicas para corregir estos problemas, denominadas como *técnicas de preprocesado*. Al aplicar estos métodos, los datos dejan de ser completamente independientes. No obstante, en la mayoría de los estudios este aspecto no se suele tener en cuenta. Tras la normalización, los datos siguen considerandose independientes por columnas (muestras) y dependientes por filas.

A la información o variables que describen y caracterizan a las muestras, las llamaremos *metadatos* o *variables fenotípicas*. En este contexto, el uso de este término es adecuado porque estas variables reflejan atributos medibles y observables de las muestras, lo que se conoce en el ámbito de la biología como *fenotipo*[14]. Normalmente tendremos varias variables fenotípicas. Llamaremos $y = (y_1, \dots, y_n)$ a los valores observados de una variable en las n muestras. Uno de los casos más típicos de variable fenotípica es cuando se tienen dos grupos de muestras: casos (individuos que tienen la enfermedad) y controles (no tienen la enfermedad o condición de interés). En este caso tendríamos $y_i = 1$, para un caso e $y_i = 0$, si es control. Si tuviéramos la situación en la que hay k grupos a comparar, con $k > 2$, entonces se utiliza $y_i \in \{1, \dots, k\}$ con $i = 1, \dots, n$. Hemos de recalcar que los valores y_k son arbitrarios y pueden tomar cualquier otro par de valores.

2.2 Problema Estadístico

Normalmente, las técnicas estadísticas utilizadas en muchos campos se basan en contextos en los que el número de muestras, n , es mayor que el de variables, N . Sin embargo, en el caso de los datos ómicos, esta relación se invierte, lo que obliga a ajustar estos procedimientos de manera que, en algunos casos, la adaptación resulta más o menos exitosa. En otras palabras, la falta de suficientes muestras para la cantidad de variables presentes, hace que sea extremadamente difícil encontrar un modelo que pueda capturar de manera precisa la relación entre las variables predictores y la

⁵Expresión génica: La expresión génica es el proceso por el cual la información codificada por un gen se usa para producir moléculas de ARN que codifican para proteínas o para producir moléculas de ARN no codificantes que cumplen otras funciones. La expresión génica actúa como un “interruptor” que controla cuándo y dónde se producen moléculas de ARN y proteínas y como un “control de volumen” para determinar qué cantidad de esos materiales se produce[13].

variable respuesta. Esto se debe a que no tenemos una cantidad adecuada de datos para entrenar de manera efectiva un modelo estadístico que pueda generalizarse de manera fiable a nuevas observaciones.

La dificultad de analizar datos de alta dimensionalidad resulta además de la conjunción de dos efectos.

En primer lugar, los espacios de alta dimensión tienen propiedades geométricas que son contra-intuitivas y alejadas de las propiedades que se pueden observar en espacios bidimensionales o tridimensionales.

En segundo lugar, las herramientas de análisis de datos suelen diseñarse teniendo en cuenta propiedades intuitivas y ejemplos en espacios de baja dimensión; por lo general, las herramientas de análisis de datos se ilustran mejor en espacios de dos y tres dimensiones, por razones obvias. El problema es que esas herramientas también se utilizan cuando los datos son de alta dimensión y más complejos. En este tipo de situaciones, perdemos la intuición del comportamiento de las herramientas y podemos sacar conclusiones erróneas sobre sus resultados, dificultando la construcción de modelos estadísticos precisos.

Por todo ello, en este contexto, las técnicas estadísticas utilizadas son mera aplicación de procedimientos diseñados para la situación antes comentada en la que el número de muestras es mayor que el de variables.

Uno de los principales retos que se abordarán es el análisis de expresión diferencial, que examina cómo varían los niveles de expresión génica entre distintas condiciones experimentales o grupos de individuos. En particular, se busca determinar si existe una relación entre el perfil de expresión génica y una variable fenotípica específica. Este enfoque, denominado análisis de expresión diferencial marginal, permite explorar asociaciones entre conjuntos de genes, organizados como grupos de filas dentro de la matriz de expresión, y la característica fenotípica de interés. A este tipo de análisis se le conoce también como análisis de conjuntos de genes o *gene set analysis*, y su objetivo es identificar patrones de expresión que puedan estar vinculados a determinados rasgos biológicos.

2.3 Transcriptómica: datos RNA-seq y single-cell RNA-seq

Entre las distintas tecnologías utilizadas en la generación de datos ómicos, la *transcriptómica* desempeña un papel fundamental en el análisis de la expresión génica, y en particular, las tecnologías de *RNA-seq* y *single-cell RNA-seq* han revolucionado este campo al permitir la cuantificación precisa de los niveles de ARN mensajero en diferentes condiciones biológicas. Estas técnicas producen datos con una estructura matricial compleja, caracterizada por un alto número de variables (genes) frente a un número reducido de muestras (individuos o células). Esta estructura plantea desafíos en términos de almacenamiento, procesamiento y análisis, debido a la alta

dimensionalidad de los datos generados. Nos centraremos en la transcriptómica por su capacidad para ofrecer una visión dinámica y profunda de la actividad celular, permitiendo identificar patrones de expresión génica que reflejan procesos biológicos clave.

En este apartado, se describirá la estructura de los datos obtenidos mediante RNA-seq y single-cell RNA-seq, y se discutirán los principales retos asociados a su manejo, desde las consideraciones técnicas hasta las implicaciones estadísticas y computacionales, que hacen de la transcriptómica un área idónea para aplicar metodologías multivariantes en la identificación de patrones biológicos.

2.3.1 ¿Qué es la transcriptómica? Tecnologías de secuenciación

La transcriptómica es la rama de la biología que estudia el conjunto completo de ARN (ácido ribonucleico) transcritos en una célula, tejido u organismo en un momento determinado, bajo condiciones específicas. A este conjunto se le denomina transcriptoma. Se centra en la cuantificación y caracterización de los distintos tipos de ARN, incluyendo ARN mensajero (mARN), ARN de transferencia (tRNA), ARN ribosomal (rRNA) y ARN no codificante (ncRNA), entre otros. Este campo ha evolucionado significativamente desde la formulación del dogma central de la biología molecular por Francis Crick en 1958, que estableció la transferencia de información genética desde el ADN al ARN y posteriormente a las proteínas.

A medida que la transcriptómica ha avanzado, se han ido desarrollando varias tecnologías para deducir y cuantificar el transcriptoma, basadas tanto en hibridación como en secuenciación. Los enfoques basados en hibridación, como los microarrays, pese a que son más económicos y tienen un alto rendimiento, dependen del conocimiento existente sobre la secuencia del genoma.

A diferencia de los métodos basados en microarrays, los enfoques basados en secuencias determinan directamente la secuencia de ARN. Inicialmente, se utilizó la secuenciación de Sanger de bibliotecas de ARN, pero era bastante costosa y de bajo rendimiento y generalmente no cuantitativa. Se desarrollaron métodos basados en etiquetas para superar estas limitaciones, pero tenían el inconveniente de que estaban basados en la costosa tecnología de secuenciación de Sanger, y una parte significativa de las etiquetas cortas no se podían asignar de forma única al genoma de referencia. Todas estas desventajas limitan el uso de la tecnología de secuenciación tradicional para anotar la estructura de los transcriptomas[15].

Tecnologías de secuenciación de ADN de alto rendimiento como *RNA-seq* y *single-cell RNA-seq* han emergido como herramientas clave para estudiar la expresión génica a gran escala. Estas técnicas permiten la cuantificación precisa de los niveles de ARN en diferentes condiciones biológicas, a diferencia de los métodos basados en microarrays, lo que proporciona información valiosa sobre la actividad celular y los mecanismos de

regulación genética. Sin embargo, los datos obtenidos mediante RNA-seq y single-cell RNA-seq poseen características específicas que influyen en su representación y análisis. Estas tecnologías generan grandes volúmenes de datos con una estructura matricial compleja, en la que el número de características (genes) supera ampliamente al número de muestras, lo que da lugar a retos significativos en términos de almacenamiento, procesamiento y análisis.

2.3.2 RNA-seq

El método RNA-seq (secuenciación de ARN) consiste en la conversión de una muestra de ARN (total o fraccionado) en una biblioteca de ADNc (ADN codificado), que luego es secuenciada utilizando tecnologías de secuenciación profunda. Genera un conjunto masivo de datos que consiste en lecturas cortas de ARN transcrito, secuencias que generalmente varían entre 30 y 400 pares de bases de longitud, representando fragmentos de transcritos provenientes de ARN mensajero (ARNm) o ARN no codificante. Estas secuencias se alinean con un genoma de referencia o con transcritos de referencia para mapear la estructura transcripcional y cuantificar la expresión génica. Una de las principales aplicaciones de RNA-seq es el análisis de expresión diferencial, mencionado en la sección previa y que abordaremos de forma práctica, que permite comparar los niveles de expresión de genes entre diferentes condiciones biológicas, como células tratadas frente a no tratadas, tejidos sanos frente a cancerosos o distintos estados del desarrollo. Esto ofrece una visión detallada de los cambios en la actividad génica y ayuda a identificar biomarcadores, rutas metabólicas alteradas o procesos reguladores clave. Además, RNA-seq no está limitado a detectar solo transcritos que corresponden a secuencias genómicas conocidas, lo que lo hace particularmente útil para organismos no modelo o cuando se carece de un genoma de referencia bien caracterizado[16].

En la secuenciación de ARN, las lecturas generadas a partir de las muestras de ARN se alinean contra un genoma de referencia o se ensamblan de nuevo para crear un *mapa transcripcional*. Si se dispone de un genoma de referencia, los datos se alinean para identificar la ubicación exacta de los transcritos en el genoma, permitiendo la cuantificación de la expresión génica. En casos donde no hay un genoma de referencia, las lecturas de ARN se ensamblan para generar una secuencia de contigs³ que luego se pueden anotar funcionalmente. Además de mapear las lecturas a un genoma, se deben identificar eventos de empalme (splicing⁴), que es crucial para detectar variantes de splicing alternativo. Este proceso es especialmente importante para genes que tienen varios exones, ya que las lecturas pueden cruzar estos empalmes y revelar alternativas de splicing que no son evidentes con tecnologías anteriores[19].

Pese a las ventajas que la RNA-seq tiene frente a tecnologías anteriores, los conjun-

³Contig: Tramo de secuencia continua in silico generada por alineamiento de lecturas de secuencias solapantes[17].

⁴Splicing: el splicing o empalme, ocurre al final del proceso de transcripción e implica cortar y reorganizar secciones de ARNm[18].

tos de datos producidos son grandes y complejos y la interpretación no es sencilla. La interpretación de los datos de secuenciación de ARN depende de la cuestión científica de interés. El objetivo principal de muchos estudios biológicos es el perfil de expresión génica entre muestras, que es particularmente relevante, por ejemplo, para experimentos controlados que comparan la expresión en cepas de tipo salvaje y mutantes del mismo tejido, comparando células tratadas versus no tratadas, cáncer versus normal, etc[20].

Por otra parte, los datos RNA-seq requieren estar en unos formatos específicos para su tratamiento. Formatos adecuados para almacenar secuencias tanto de ácidos nucleicos como de proteínas. Estos son: formato *FASTA* y *FASTQ*. La información que presentamos a continuación ha sido extraída de[9].

- **Formato FASTA:** basado en texto, es usado para representar secuencias de nucleótidos o de aminoácidos, ambos representados mediante una sola letra. Incluye símbolos para representar huecos (*gaps*) o posiciones desconocidas en la secuencia. Consta de dos líneas:
 - La primera línea comienza con el símbolo `>`, junto con una descripción de la secuencia.
 - La segunda, contiene la secuencia de bases o aminoácidos.

Pese a que no hay restricciones en el número de filas, el número de columnas no debería superar las 80.

- **Formato FASTQ:** es el más popular y consiste en cuatro líneas por lectura:
 - La primera comienza con el carácter `"@"` y contiene el nombre de la secuencia. Opcionalmente, puede incluir una descripción.
 - La segunda línea contiene la secuencia con las letras correspondientes, dependiendo del tipo de secuencia del que se trate (nucleótido o aminoácido).
 - La tercera comienza con el carácter `"+"` y contiene información opcional sobre la secuencia.
 - La cuarta y última línea cuantifica la calidad o confiabilidad de cada base en la secuencia recogida en la segunda línea, basada en el índice *Phred* y su codificación.

Ejemplo

```
@SRR1293399.1 ILLUMINA-545855_0026_FC629BG:6:1:1022:5049 length=50
ACAGGGACGCCATCGAATCCGGATCNTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
+SRR1293399.1 ILLUMINA-545855_0026_FC629BG:6:1:1022:5049 length=50
dee\edYcdc`bbY`S]bb_]Ua^BBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBB
```

2.3.3 scRNA-seq (single-cell RNA-seq)

La secuenciación de ARN ha impulsado muchos descubrimientos e innovaciones en diversos campos en los últimos años. Por razones prácticas, la técnica RNA-seq suele realizarse en muestras que comprenden entre miles y millones de células. Sin embargo, esto ha dificultado la evaluación directa de la unidad fundamental de la biología: la célula. Es por esto que surge una variante a la RNA-seq: *scRNA-seq* (*single-cell RNA-seq*), que se ha extendido considerablemente hasta consolidarse como la opción principal en investigación de la diversidad celular, ya que posibilita el estudio individual de cada célula dentro de una misma muestra. Es una tecnología que permite la cuantificación y comparación de los transcriptomas de células individuales, logrando una disección de la expresión génica a resolución de una sola célula y describiendo moléculas de ARN con alta precisión y a escala genómica. Además, otro aspecto importante de esta técnica es que permite analizar la heterogeneidad celular; evaluar las similitudes y diferencias transcripcionales dentro de una población de células, lo que ha permitido una comprensión más detallada de los procesos moleculares al evidenciar la variabilidad existente dentro de una misma población celular.

Aunque existe una gran confianza en la utilidad general de scRNA-seq, hay una barrera técnica que debe considerarse cuidadosamente: el aislamiento efectivo de células individuales del tejido de interés, pues existe un riesgo potencial de que los protocolos utilizados para este proceso alteren los niveles de ARNm. Aunque las células vecinas pueden contribuir a mantener los estados celulares, scRNA-seq opera bajo el supuesto de que el aislamiento de células individuales no desencadena cambios transcriptómicos antes de la captura del ARNm. Además, esta técnica a menudo requiere el uso de marcadores específicos para distinguir con precisión diferentes poblaciones celulares, lo que puede añadir complejidad al diseño experimental. A esto se suman limitaciones relacionadas con el tiempo y los costos asociados, que pueden dificultar la realización de investigaciones a gran escala.

El análisis de datos provenientes de scRNA-seq supone un desafío computacional considerable debido a su alta dimensionalidad y a la presencia de ruido significativo. En el estudio de muestras heterogéneas, es fundamental identificar las distintas subpoblaciones celulares presentes, lo que requiere el desarrollo de algoritmos capaces de descomponer la mezcla de expresión génica obtenida. Para ello, se aplican técnicas de normalización y reducción de dimensionalidad, como el análisis de componentes principales (PCA), entre otras, que permiten segmentar las células en función de sus perfiles de expresión. No obstante, la presencia de efectos por lote y la variabilidad técnica pueden introducir sesgos en los resultados, lo que hace necesario implementar estrategias de corrección para garantizar la robustez del análisis y evitar la aparición de artefactos en la identificación de patrones biológicos.

Además, el volumen de datos generado por scRNA-seq plantea retos en términos de almacenamiento, gestión y escalabilidad computacional. La integración de millones

de lecturas individuales requiere estrategias eficientes de compresión y procesamiento distribuido, así como el uso de infraestructuras de alto rendimiento para análisis en estudios de gran escala. Dado que el aislamiento manual de células en el laboratorio puede ser costoso y técnicamente desafiante, se han propuesto enfoques computacionales que permitan inferir la composición celular sin necesidad de manipulación experimental. En este contexto, los métodos multivariantes desempeñan un papel clave en la extracción de información relevante, facilitando la identificación de estructuras en los datos sin necesidad de un conocimiento previo sobre los tipos celulares presentes en la muestra. La combinación de técnicas estadísticas y aprendizaje automático ha demostrado ser esencial para mejorar la precisión y fiabilidad de estos análisis en el ámbito biomolecular.

Dado que scRNA-seq es una variante de RNA-seq, hereda sus formatos de almacenamiento iniciales, principalmente FASTA y FASTQ, siendo este último el formato más crudo en el que se encuentran los datos de scRNA-seq.

Toda la información recogida en esta subsección ha sido extraída de las fuentes bibliográficas[21],[22],[23].

Parte II

FUNDAMENTOS MATEMÁTICOS

3 Técnicas multivariantes: fundamentos y desarrollo del análisis clúster

El análisis de datos en ciencias ómicas requiere metodologías capaces de manejar la complejidad inherente a los sistemas estudiados. En particular, las técnicas multivariantes han demostrado ser herramientas fundamentales para la exploración, modelado e interpretación de datos de alta dimensión. Estas metodologías permiten identificar relaciones entre variables, reducir la dimensionalidad y clasificar observaciones en función de patrones subyacentes.

Este capítulo está estructurado en dos secciones. En primer lugar, se presentarán las principales técnicas multivariantes, destacando su utilidad y objetivos dentro del análisis de datos. Posteriormente, se abordará en profundidad el análisis clúster, una técnica multivariante ampliamente utilizada para la identificación de patrones en grandes volúmenes de datos. Su aplicación en el ámbito biológico permite revelar estructuras subyacentes en datos complejos, facilitando la comprensión de procesos como la agrupación de expresiones génicas o la clasificación de organismos en función de sus características.

Dado que en el capítulo dedicado a los datos ómicos hemos introducido la matriz de datos ómicos X , que representa las N características medidas sobre n muestras, mantendremos esta notación en el desarrollo de los fundamentos matemáticos sobre los que se basa este trabajo. Así, consideraremos que la matriz de expresión $X \in \mathbb{R}^{N \times n}$ almacena las observaciones de nuestras variables, con filas representando las características y columnas las muestras.

3.1 Preliminares

La información aquí recogida se ha extraído de las fuentes[24],[25],[26].

El análisis multivariante es una herramienta clave para explorar y comprender la complejidad de los sistemas biológicos, económicos y sociales. Su capacidad para procesar múltiples variables simultáneamente permite identificar patrones ocultos en grandes volúmenes de datos.

Las técnicas multivariantes son fundamentales para abordar la complejidad de los datos en diversas disciplinas, incluyendo las ciencias ómicas, donde se requieren metodologías capaces de gestionar la alta dimensionalidad y variabilidad de los datos obtenidos. Estas herramientas permiten descubrir relaciones entre variables, reducir la

dimensionalidad y clasificar observaciones, lo que facilita la interpretación y el modelado de sistemas complejos.

El desarrollo del análisis multivariante se remonta a principios del siglo XX, cuando pioneros como Karl Pearson y R.A Fisher introdujeron técnicas fundamentales como el análisis de componentes principales y el análisis discriminante. Posteriormente, C.R. Rao y otros investigadores expandieron estos métodos, estableciendo bases matemáticas sólidas que han permitido su aplicación en un amplio espectro de disciplinas. Estas técnicas han ido desarrollándose exponencialmente con el avance de la computación, facilitando el procesamiento de grandes volúmenes de datos y dando lugar a análisis mucho más sofisticados en muchas áreas como la biología, la economía, las ciencias sociales, etc.

En términos generales, las metodologías multivariantes pueden dividirse en dos grandes enfoques: *descriptivo* e *inferencial*. El primero busca simplificar la estructura de los datos y revelar relaciones latentes entre variables, mientras que el segundo permite realizar pruebas de hipótesis considerando múltiples variables de manera simultánea, asegurando la validez estadística de los resultados. La elección de la técnica adecuada depende del tipo de datos y de la pregunta de investigación. A continuación, se presentan algunas de las principales metodologías multivariantes:

3.1.1 Análisis de Componentes Principales (PCA)

El *análisis de componentes principales (PCA)* fue introducido por primera vez por Karl Pearson a principios del siglo XX. El tratamiento formal de esta técnica se debe a Hotelling (1933) y Rao (1964). Su propósito era facilitar la comprensión de conjuntos de datos complejos mediante la reducción de su dimensionalidad, minimizando la pérdida de información. En PCA, un conjunto de N variables correlacionadas se transforma en un conjunto más pequeño de constructos hipotéticos no correlacionados llamados *componentes principales* (CP). Su objetivo es condensar la información proporcionada por dichas variables en unas pocas de ellas o en pocas combinaciones lineales de ellas (con máxima variabilidad).

Las componentes principales se definen como combinaciones lineales de las variables originales que capturan la mayor variabilidad posible en los datos. Matemáticamente, si Y es un vector de N variables observadas con media μ y matriz de covarianza Σ , las componentes principales Z_i se obtienen como:

$$Z_i = p_i' Y, \quad i = 1, 2, \dots, N$$

donde p_i es un vector de pesos o *cargas principales* que maximizan la varianza de Z_i bajo la restricción de que p_i tiene norma unitaria, es decir,

$$\max \text{Var}(Z_i) = p_i' \Sigma p_i, \text{ sujeto a } p_i' p_i = 1.$$

y tal que asegura que las componentes principales son ortogonales entre sí, es decir:

$$p_i' p_j = 0, \text{ para } i \neq j.$$

Así, garantizamos que las componentes principales Z_i y Z_j son intercorrelacionadas, es decir, su covarianza es cero para $i \neq j$.

Los vectores p_i son los autovectores de la matriz de covarianza Σ , y los valores propios λ_i , corresponden a la varianza explicada por cada componente principal. La transformación completa de los datos se expresa de la siguiente forma:

$$Z = P' Y$$

donde P es la matriz de autovectores de Σ , lo que garantiza que las componentes principales sean ortogonales entre sí y no correlacionadas, cada una con las anteriores.

Las CP se utilizan para descubrir e interpretar las dependencias que existen entre las variables y para examinar las relaciones que pueden existir entre los individuos. También son útiles para estabilizar las estimaciones, evaluar la normalidad multivariante y detectar valores atípicos.

3.1.2 Análisis factorial

El objetivo principal del *análisis factorial* (AF) es capturar la realidad de la manera más simple posible, identificando unas pocas variables latentes⁸ que definen esa realidad. Esta técnica multivariante busca explicar el comportamiento de las N variables en la matriz de datos X utilizando un número reducido de variables latentes, denominadas *factores*. Lo ideal es que toda la información contenida en X pueda ser representada mediante un número menor de factores. Esta técnica busca explicar las correlaciones entre las variables mediante la combinación lineal de dichos factores. Así, cada factor es una variable latente que influye en las variables observadas, y cuya presencia se infiere a partir de las correlaciones entre ellas.

Matemáticamente, cada variable observada, $x_i \in \mathbb{R}^N$, se expresa como una combinación lineal de estos factores, más un término de error específico:

$$x_i = \sum_{l=1}^k q_{il} f_l + \mu_i + e_i, \quad i = 1, \dots, N.$$

donde, $q_{il} \in [q_{il}]_{N \times k}$ es una matriz de pesos, f_l , con $l = 1, \dots, k$ son los factores, μ_i denota la media de la variable x_i y e_i es la componente i -ésima del vector de errores aleatorios, $e_{N \times 1}$. El número de factores, k , debería ser siempre mucho más pequeño que N .

⁸Variable latente: variable no observable que se infiere a partir de un conjunto de variables observables utilizando un modelo matemático.

En definitiva, el modelo de análisis factorial asume que la variable observada x puede descomponerse en dos componentes: una parte explicada por los factores comunes y una parte específica de cada variable. Esto se expresa matricialmente de la siguiente forma:

$$x = \Lambda F + \psi$$

donde:

- Λ es la matriz de cargas factoriales de dimensión $N \times k$,
- F es el vector de factores de dimensión k .
- ψ es el vector de factores específicos o residuales de dimensión N

El análisis factorial fue desarrollado por Charles Spearman a principios del siglo XX para modelar la inteligencia humana, postulando que las puntuaciones en distintas pruebas estaban intercorrelacionadas debido a un único factor latente de inteligencia general. Su modelo de un solo factor fue posteriormente generalizado por Thurstone a múltiples factores.

El análisis de componentes principales (PCA) y el análisis factorial suelen confundirse porque ambos analizan la variación en un conjunto de variables a partir de la matriz de correlación o covarianza. Sin embargo, mientras que en el AF unas pocas variables latentes explican las correlaciones observadas, en el PCA se necesitan todos los componentes principales para describir completamente la variabilidad. Así, el PCA se centra en explicar la varianza total, mientras que el AF se enfoca en las relaciones entre las variables mediante factores comunes.

3.1.3 Análisis Discriminante

El *análisis discriminante* es una técnica multivariante que permite identificar un subconjunto de variables y funciones asociadas que maximicen la separación entre los grupos o poblaciones de estudio. Su objetivo principal es construir funciones discriminantes que describan y caractericen la separación de los grupos, evaluar el grado de diferenciación y analizar la contribución de cada variable a la discriminación.

Cuando estas funciones son combinaciones lineales de las variables originales, se denominan funciones discriminantes lineales (LDF). En particular, el análisis discriminante lineal de Fisher busca encontrar una combinación lineal de variables que maximice la separación entre grupos. Para dos grupos con medias μ_1 y μ_2 y una matriz de covarianza común Σ , la función discriminante de Fisher se define como:

$$L = a' y = \sum_{j=1}^N a_j y_j$$

donde a es el vector de coeficientes de la función discriminante e y es el vector de observaciones de las variables.

El vector a que maximiza la separación entre los grupos se obtiene como:

$$a_{\Sigma} = \Sigma^{-1}(\mu_1 - \mu_2)$$

Además, la *distancia de Mahalanobis*, que explicaremos con detalle en la siguiente sección, se emplea para medir la separación entre los centroides de los grupos:

$$D^2 = (\mu_1 - \mu_2)' S^{-1} (\mu_1 - \mu_2)$$

Si D^2 es significativo, implica una buena discriminación entre los grupos.

Este análisis tiene aplicaciones en diversos campos: en biología, Fisher (1936) lo utilizó para diferenciar especies de iris en función de características morfológicas; en la gestión de personal, permite clasificar profesionales según sus habilidades; en medicina, ayuda a distinguir entre individuos con alto o bajo riesgo de enfermedades; y en la industria, contribuye a identificar cuándo un proceso está bajo control o fuera de control.

Para el caso de múltiples grupos, la función discriminante se construye de manera que maximice la variabilidad entre los grupos en relación con la variabilidad dentro de los grupos, lo que se logra mediante una descomposición en valores propios.

Toda la información ha sido extraída de las fuentes bibliográficas[27],[28][29],[30]

3.2 Análisis Clúster

3.2.1 Introducción

Un ser inteligente no puede tratar cada objeto que ve como una entidad única, diferente de cualquier otra en el universo. Debe categorizar los objetos para poder aplicar el conocimiento adquirido con tanto esfuerzo sobre objetos similares encontrados en el pasado al objeto en cuestión.

Steven Pinker, Cómo funciona la mente, 1997

Una de las habilidades básicas que poseemos los seres humanos es la de agrupar objetos similares para generar una clasificación. Esta idea de clasificar cosas similares en categorías es bastante primitiva. Nuestros antepasados prehistóricos debían ser capaces de darse cuenta de que muchos objetos tenían propiedades semejantes, como ser comestibles, venenosos, peligrosos, etc.

Organizar datos en grupos razonables es uno de los modos más fundamentales de comprensión y aprendizaje. De hecho, es vital para el desarrollo del lenguaje, el cual

consiste en palabras que nos ayudan a reconocer y analizar los diferentes tipos de eventos, objetos y personas con los que nos relacionamos. Por ejemplo, los sustantivos en una lengua son palabras que describen una clase de cosas que comparten unas características comunes; gatos, perros, caballos, etc., y dicho nombre agrupa a los individuos en grupos.

Además de ser una actividad conceptual humana básica, la clasificación es fundamental en muchas ramas de la ciencia. En biología, por ejemplo, la clasificación de organismos (*taxonomía*) ha sido una gran preocupación desde las primeras investigaciones. Aristóteles ya ideó un sistema para clasificar las especies del reino animal; comenzó dividiendo a los animales en dos grupos: los que tienen sangre roja (vertebrados) y los que carecen de ella (invertebrados). Además subdividió estos grupos según su forma de reproducirse: vivas, en huevos, en pupas, etc. Luego, Theophrastos escribió lo relativo a las plantas. Los libros resultantes estaban tan bien documentados y eran tan completos, tan profundos y de un alcance tan amplio que sentaron las bases de la investigación biológica durante siglos.

No fue ya hasta los siglos XVII y XVIII cuando los exploradores europeos crearon un nuevo programa similar de investigación y recolección bajo la dirección del sueco Linnaeus, quien estableció un sistema de clasificación que sentó las bases de la taxonomía moderna. Su método no solo organizaba a los seres vivos en categorías jerárquicas, sino que también reflejaba una idea más profunda: la clasificación es esencial para el conocimiento.

En este sentido, todo el conocimiento real que poseemos, depende de métodos con los que podamos distinguir lo similar de lo diferente. Cuanto mayor sea el número de distinciones naturales que un método comprenda, más clara será nuestra idea de las cosas. A medida que el número de objetos de estudio crece, la necesidad de desarrollar sistemas de clasificación más precisos se vuelve aún más necesaria.

En cierto nivel, un esquema de clasificación puede simplemente representar un método conveniente para organizar un gran conjunto de datos, de modo que se pueda comprender con mayor facilidad y la información se recupere de forma más eficiente. Si los datos pueden resumirse adecuadamente mediante un pequeño número de grupos de objetos, las etiquetas de grupo pueden proporcionar una descripción muy consisa de los patrones de similitudes y diferencias entre los datos. La necesidad de resumir conjuntos de datos de esta manera es cada vez más importante debido al creciente número de grandes bases de datos disponibles en muchas áreas de la ciencia, como la transcriptómica, que es la que nos ocupa en este trabajo, y la exploración de dichas bases de datos mediante *análisis clúster* y otras técnicas de análisis multivariante se denomina hoy día *minería de datos*.

Las técnicas numéricas de clasificación se originaron principalmente en las ciencias naturales, con el objetivo de liberar a la taxonomía de su naturaleza tradicionalmente

subjetiva. El objetivo era dar clasificaciones objetivas y estables. Objetivas en el sentido de que el análisis del mismo conjunto de organismos mediante la misma secuencia de métodos numéricos produce la misma clasificación; estables en cuanto a que la clasificación permanece igual ante la adición de organismos o de nuevas características que los describen.

Se le han dado muchos nombres a estas técnicas numéricas, dependiendo del área de aplicación. En biología, el término más extendido es el de *taxonomía numérica*. En psicología, se usa mucho el término *análisis Q*. En inteligencia artificial, el reconocimiento de patrones no supervisado es el término predilecto. Sin embargo, hoy en día, el *análisis clúster* es probablemente el término genérico para los procedimientos que buscan descubrir grupos en los datos.

La información recogida en esta introducción ha sido extraída de la fuente bibliográfica[31].

3.2.2 ¿Qué es el Análisis Cluster (AC)?

El *análisis cluster* puede definirse como el estudio formal de los algoritmos y métodos de clasificación de objetos. Un objeto es descrito por un conjunto de mediciones o bien de relaciones entre el objeto y otros objetos. No usa etiquetas de categoría que etiqueten objetos con identificadores previos. A diferencia del análisis discriminante, el análisis clúster no utiliza etiquetas predefinidas para clasificar los objetos, sino que busca descubrir estructuras en los datos de manera autónoma.

El objetivo del análisis cluster es agrupar objetos formando conjuntos (clusters) en los que los elementos dentro de cada uno sean lo más similares posible entre sí (baja variabilidad interna), mientras que los diferentes grupos sean lo más distintos entre sí (alta variabilidad entre ellos). Es, en definitiva, una técnica exploratoria que identifica patrones de similitud dentro de un conjunto de datos, agrupando elementos con características comunes mientras mantiene separadas las estructuras con mayores diferencias[32].

Un cluster puede entenderse como un conjunto de elementos que presentan una alta cohesión interna (homogeneidad) y una clara separación externa con respecto a otros grupos. Sin embargo, la definición formal de un cluster es difícil de establecer y depende en gran medida del juicio del usuario y del contexto en el que se aplica. Mientras que algunos métodos de análisis buscan identificar estructuras naturales en los datos, en muchas ocasiones el proceso de agrupamiento puede imponer una estructura artificial en la información. Esto resalta la importancia de interpretar con cautela los resultados de un análisis de clusters, ya que no siempre reflejan patrones inherentes a los datos, sino que pueden ser el resultado de los criterios específicos utilizados en la clasificación[31].

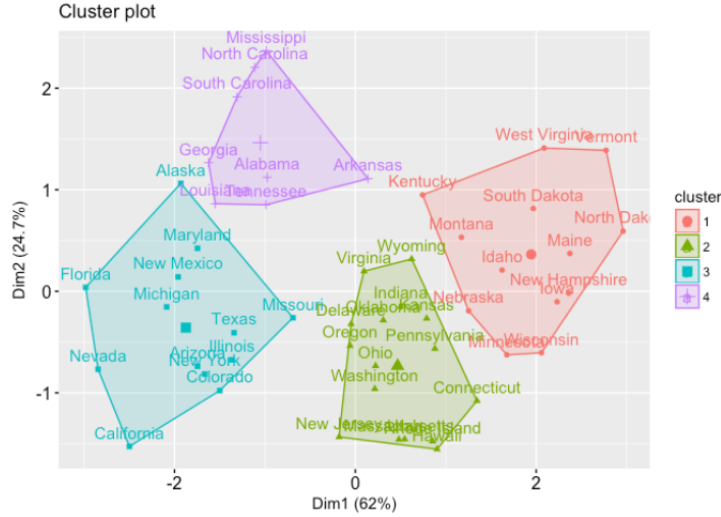


Figure 3.1: Ejemplo de clustering[33].

En la mayoría de las aplicaciones del AC se busca una partición de los datos en la que cada individuo u objeto pertenezca a un único cluster y el conjunto completo de clusters contenga a todos los individuos. Sin embargo, esto no siempre es así y, de hecho, en algunas circunstancias, la superposición de clusters puede ofrecer una solución más aceptable. Decimos que una respuesta aceptable del análisis cluster es que no se justifica la agrupación de los datos. El análisis cluster es un procedimiento objetivo; no están predefinidos, sino que se forman a medida que avanza el análisis.

Los datos básicos para la mayoría de las aplicaciones del análisis cluster se almacenan en una matriz $n \times p$, X , que contiene los valores de las variables que describen cada objeto que se va a agrupar, es decir,

$$X = [x_{ij}]_{i=1,\dots,n,j=1,\dots,p} = \begin{bmatrix} x_{11} & x_{12} & \cdots & x_{1p} \\ x_{21} & x_{22} & \cdots & x_{2p} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ x_{n1} & x_{n2} & \cdots & x_{np} \end{bmatrix}$$

donde x_{ij} cuantifica la variable j en la muestra i . El AC tratará de desarrollar un esquema de clasificación que particionará las filas de X en k clusters[31].

3.2.3 Medidas de proximidad

Para desarrollar esta sección se han utilizado las siguientes referencias bibliográficas:[29][31].

Dado que el análisis cluster trata de identificar los vectores que son similares y agruparlos en clusters, es esencial contar con herramientas que permitan evaluar la cercanía o distancia entre los objetos que se están agrupando: las *medidas de proximidad*.

Las decisiones sobre cómo se van a formar los clusters dependen directamente de las medidas de proximidad utilizadas, ya que estas definen cómo se calcula la similitud o diferencia entre los distintos elementos.

Si una medida de proximidad representa *similitud*, el valor de la medida incrementa cuanto más similares sean dos objetos. Alternativamente, si la medida de proximidad representa *disimilitud*, el valor de la medida disminuye a medida que dos objetos se vuelven más parecidos.

Medidas de Disimilaridad

Cuando todas las variables registradas son continuas, las proximidades entre los individuos generalmente se cuantifican mediante medidas de disimilaridad o medidas de distancia. Por ello, definiremos el concepto de *disimilaridad* análogamente al de distancia.

Definición 3.1. Sean $\Omega \subset \mathbb{R}^n$ un conjunto de puntos de \mathbb{R}^n y $x, y \in \Omega$ dos puntos cualesquiera de dicho conjunto. Entendemos por disimilaridad a toda aplicación $d : \Omega \times \Omega \rightarrow \mathbb{R}$ que satisface las siguientes propiedades:

- i) $d(x, y) \geq 0$
- ii) $d(x, y) = 0 \iff x = y$
- iii) $d(x, y) = d(y, x)$ (simétrica)

Se dice que la disimilaridad es *métrica* si satisface una cuarta propiedad:

iv) $d(x, y) \leq d(x, z) + d(z, y) \forall z \in \Omega,$

y se dirá *ultramétrica* si es métrica y además cumple:

v) $d(x, y) \leq \max\{d(x, z), d(y, z)\}$

A continuación presentamos algunas de las medidas de disimilaridad más usadas. Hemos de hacer notar que estas medidas normalmente se usan para medir cuán próximos están los individuos, pero si se quiere medir entre variables, también son válidas. Simplemente habría que trasponer la matriz X y trabajar con ella.

Toda la información que sigue a partir de este punto, ha sido extraída de las fuentes bibliográficas: [26], [29], [30], [31], [34].

Medidas de disimilaridad

Las medidas de disimilaridad se usan ante la necesidad de agrupar objetos con características similares. Una medida de disimilaridad adecuada es la distancia entre dos observaciones. Se considera una medida de disimilaridad por el hecho de que la distancia aumenta conforme dos individuos se alejan.

Una gran variedad de distancias pueden generarse mediante la norma¹⁰ L_r , $r \geq 1$,

$$d_{ij} = \|x_i - x_j\|_r = \left\{ \sum_{k=1}^p |x_{ik} - x_{jk}|^r \right\}^{\frac{1}{r}} \quad (1)$$

donde x_{ik} denota el valor de la k -ésima variable en el objeto i . A esta distancia se la conoce por el nombre de *distancia de Minkowski*

En lo que sigue, consideremos $x_i, x_j \in \mathbb{R}^p$ dos individuos de la población. Esto es, dos filas de la matriz X que contine los datos. Definimos las siguientes medidas de disimilaridad:

Definición 3.2. Definimos la *distancia euclídea* como la derivada de la norma L_2 (caso particular de la distancia de Minkowski cuando $r = 2$),

$$d_2(x_i, x_j) = \|x_i - x_j\|_2 = \sqrt{(x_i - x_j)'(x_i - x_j)} = \sqrt{\sum_{j=1}^p (x_j - y_j)^2}$$

De entre todas las medidas de disimilaridad, y de todas las métricas de Minkowski, la distancia Euclídea es la más común. Hemos de tener en cuenta que la distancia euclídea (y la euclídea al cuadrado) suelen calcularse a partir de datos en bruto, no de datos estandarizados. Esto presenta varias ventajas (p. ej., la distancia entre dos objetos cualesquiera no se ve afectada por la adición de nuevos objetos al análisis, que podrían ser valores atípicos). Sin embargo, las distancias pueden verse considerablemente afectadas por las diferencias de escala entre las dimensiones a partir de las cuales se calculan. Por ejemplo, si una de las dimensiones representa una longitud medida en centímetros y luego se convierte a milímetros (multiplicando los valores por 10), las distancias euclidianas o euclidianas al cuadrado resultantes (calculadas a partir de múltiples dimensiones) pueden verse considerablemente afectadas y, en consecuencia, los resultados de los análisis de conglomerados pueden ser muy diferentes.

¹⁰Norma: Una *norma* en un espacio vectorial X es una aplicación $\|\cdot\| \rightarrow \mathbb{R}$ que verifica:

(N.1) Desigualdad triangular: $\|x + y\| \leq \|x\| + \|y\| \forall x, y \in X$

(N.2) Homogeneidad por homotecias: $\|\lambda x\| = |\lambda| \|x\| \forall x \in X, \lambda \in \mathbb{R}$

(N.3) No degeneración: $x \in X, \|x\| = 0 \Rightarrow x = 0$. [35]

Observación 3.3. La distancia euclídea al cuadrado puede resultar útil para asignar progresivamente mayor importancia a los objetos más separados. Además, al evitar las raíces cuadradas, los cálculos se amenizan.

Definición 3.4. Se denomina distancia *Manhattan*, *City Block*, *Hamming*, o d_1 , a la distancia derivada de la norma L_1 , que viene dada por

$$d_1(x_i, x_j) = \sum_{k=1}^p |x_{ik} - x_{jk}|$$

Se utiliza cuando todas las características (variables) son binarias y mide el número de características en las que dos individuos difieren.

Definición 3.5. Tomando límite cuando $r \rightarrow \infty$, la distancia derivada del límite de la norma L_r , llamada *norma del máximo*, L_∞ , es la que se conoce como *distancia de Chebychev*, y viene dada por

$$d_\infty(x_i, x_j) = \max_{k=1, \dots, p} |x_{ik} - x_{jk}|$$

Observación 3.6. La distancia euclídea la podemos ver como un caso particular de la distancia:

$$d_M(x_i, x_j) = \sqrt{(x_i - x_j)' M (x_i - x_j)}$$

cuando $M = I_p$, la matriz identidad de orden p .

Supongamos que M es la matriz de covarianzas de las variables (las columnas de la matrix X de datos), que se define de la siguiente forma:

$$M = \Sigma = \frac{1}{p} \sum_{i=1}^n (x_{ij} - \bar{x}_j)(x_{ij} - \bar{x}_j)', \quad j = 1, \dots, p$$

Podemos observar que si $p \geq n$, la matriz de covarianzas Σ , es definida positiva y, por consiguiente, es invertible. Esto nos permite definir la siguiente medida de disimilaridad:

Definición 3.7. Definimos la *distancia de Mahalanobis* para individuos, como:

$$D_\Sigma(x_i, x_j) = \sqrt{(x_i - x_j)' \Sigma^{-1} (x_i - x_j)}$$

A diferencia de la distancia Euclídea, la de Mahalanobis es invariante frente a cambios de escala. En efecto, sea $C_{n \times n}$ una matriz no singular de orden n , entonces:

$$\begin{aligned} D_\Sigma(Cx_i, Cx_j) &= \sqrt{(Cx_i, Cx_j)' \left[\frac{1}{p} C(x_{ij} - \bar{x}_j)(x_{ij} - \bar{x}_j)' C' \right]^{-1} (Cx_i, Cx_j)} = \\ &= \sqrt{(x_i, x_j)' C' (C')^{-1} \left[\frac{1}{p} (x_{ij} - \bar{x}_j)(x_{ij} - \bar{x}_j)' \right]^{-1} C^{-1} C (x_i, x_j)} = \end{aligned}$$

$$= \sqrt{(x_i - x_j)' \Sigma^{-1} (x_i - x_j)} = D_{\Sigma}(x_i, x_j)$$

La distancia de Mahalanobis no se usa comúnmente en técnicas de clustering porque calcula la matriz Σ considerando todos los individuos juntos, en lugar de tratar los objetos de cada clúster por separado. Además, su cálculo es más complejo que el de otras métricas. Sin embargo, puede aplicarse dentro de cada clúster en una fase específica del proceso[36].

3.2.4 Medidas de similitud

Esta subsección ha sido escrita en base a la información recogida en la referencia bibliográfica[29].

Como en la subsección anterior, consideremos x_i, x_j dos vectores cualesquiera de \mathbb{R}^p .

Definición 3.8. Sea $\Omega \subset \mathbb{R}^n$ un conjunto de puntos de \mathbb{R} . Llamaremos *similitud* a toda aplicación $s : \Omega \times \Omega \rightarrow \mathbb{R}$ que satisfaga las siguientes propiedades:

- i) $0 \leq s(x_i, x_j) \leq 1$
- ii) $s(x_i, x_j) = 1$ si y solo si $x_i = x_j$
- iii) $s(x_i, x_j) = s(x_j, x_i)$ (simétrica)

Las condiciones (i) y (ii) aseguran que toda similitud es siempre positiva e idénticamente 1 cuando los objetos i y j sean iguales.

Observación 3.9. Podemos formar una disimilitud a partir de una similitud, sin más que hacer:

$$d_{ij} = 1 - s_{ij}$$

u otra función decreciente. Sin embargo, a diferencia de las disimilitudes, no constituye una métrica.

Naturalmente, podríamos pensar si esto también ocurre a la inversa, es decir, si dada una medida de disimilitud d_{ij} , podemos construir una medida de similitud, sin más que despejar s_{ij} en la anterior expresión:

$$s_{ij} = 1 / (1 + d_{ij})$$

Pero como d_{ij} no está acotada superiormente, $s_{ij} \in (0, 1]$, lo cual implica que $s_{ij} \neq 0$. Es por ello que no se pueden crear similitudes a partir de disimilitudes.

A continuación presentamos las principales medidas de similitud que se usan en el ámbito del análisis cluster.

Definición 3.10. Definimos el *coeficiente de correlación de Pearson* entre los objetos x_i, x_j , como

$$q_{ij} = \frac{\sum_{k=1}^p (x_{ik} - \bar{x}_i)(x_{jk} - \bar{x}_j)}{[\sum_{k=1}^p (x_{ik} - \bar{x}_i)^2 \sum_{k=1}^p (x_{jk} - \bar{x}_j)^2]}$$

donde $\bar{x}_i = \sum_{k=1}^p \frac{x_{ik}}{p}$ y $\bar{x}_j = \sum_{k=1}^p \frac{x_{jk}}{p}$.

Observación 3.11. Dado que $q_{ij} \in [-1, 1]$, es claro que no satisface la primera condición necesaria para ser una similaridad. No obstante, esto cambia si consideramos en su lugar, el valor absoluto del mismo, $|q_{ij}|$, o bien tomando $1 - q_{ij}^2$.

Presentamos ahora otra medida de similaridad para las filas de X .

Definición 3.12. Definimos el *coseno del ángulo* θ entre los vectores x_i, x_j como

$$\cos\theta = c_{ij} = \frac{x_i' x_j}{\|x_i\| \|x_j\|}$$

Observación 3.13. Podemos ver que estamos en la misma situación que antes, $c_{ij} \in [-1, 1]$, lo cual indica que no verifica la propiedad 1 de las medidas de similaridad. La solución a esto es la misma que en el caso anterior: trabajar con $\|q_{ij}\|$ o $\|1 - q_{ij}^2\|$.

3.2.5 Métodos jerárquicos

Los *métodos jerárquicos* para el análisis cluster representan un intento de encontrar buenos clusters en los datos mediante la combinación o división de clusters, con el propósito de minimizar (maximizar) una medida de disimilaridad (similaridad). Hay dos tipos de métodos jerárquicos: los *aglomerativos* y los *disociativos*. Los aglomerativos comienzan con clusters que contienen un solo objeto y sucesivamente van combinando clusters hasta que todos forman un único cluster. Los disociativos, por su parte, hacen justo lo contrario: comienzan con todos los objetos agrupados en un único cluster, a continuación dividen dicho cluster en dos clusters separados, y así sucesivamente hasta formar clusters con un solo objeto.

Observación 3.14. Aunque se le suele prestar más atención a los métodos aglomerativos, los disociativos proporcionan clusterings más sofisticados y robustos.

Dendrograma

El resultado final de todo método jerárquico es lo que se conoce como *dendrograma* o *diagrama en árbol jerárquico*. Es una representación gráfica del clústering que generalmente se dibuja en sentido inverso, comenzando desde el último cluster que se ha formado y que engloba a todos los objetos y desde similaridad 0. En el punto de similaridad donde dos clusters se combinan para dar lugar al cluster final, este se divide en dos clusters padres y así sucesivamente; la solución con k clusters se obtiene fusionando

algunos clusters de la solución con $(k + 1)$.

El dendrograma puede dibujarse horizontal o verticalmente, queda a elección de cada uno; ambas formas proporcionan la misma información. En nuestro caso, lo consideraremos en vertical. Nos permite determinar la altura del criterio de unión a la que los clusters se combinan para formar un nuevo cluster más grande. Los elementos similares se combinan a alturas bajas, mientras que los elementos más disímiles se combinan a mayor altura en el dendrograma. Por lo tanto, es la diferencia de alturas la que define la proximidad de los individuos entre sí. Cuanto mayor sea la distancia entre las alturas a las que se combinan los clusters, más fácilmente podremos identificar la estructura sustancial de los datos.

Cortando el dendrograma a una altura adecuada, podremos obtener una partición de los datos en un número específico de grupos. Si dibujamos una línea horizontal a una altura adecuada, el número, k , de líneas verticales intersecadas por dicha línea horizontal determina una solución con k clusters. Por tanto, estamos diciendo que cada intersección de la horizontal con una de las k líneas verticales representa un cluster y los elementos que están por debajo de dicha intersección serán los elementos que conforman el cluster.

Nos podemos preguntar cómo saber a qué altura cortar el dendrograma. La respuesta es que depende; deberemos cortar a aquella altura que mejor represente los datos de entrada.

Nota 1. Cabe remarcar que, si bien las distancias verticales son importantes a la hora de determinar una solución, las horizontales son totalmente irrelevantes.

Ejemplo 3.15. Vemos qué información nos puede dar este dendrograma sobre el número de clusters, aproximado, en los que podríamos agrupar un conjunto de datos:

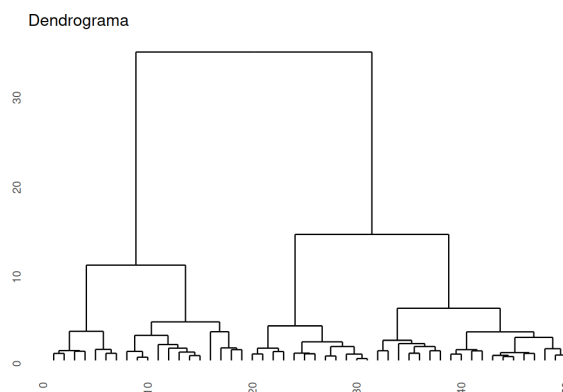


Figure 3.2: Ejemplo de dendrograma.

Aclaremos que en el eje vertical tenemos la *distancia euclídea* que existe entre cada

grupo y en el eje horizontal, los datos. Las línea verticales son los agrupamientos que, a medida que vamos subiendo, van disminuyendo, hasta acabar en uno solo. Observamos que hay una gran separación entre las ramas en un entorno alrededor de 10, por lo que, si trazáramos una línea horizontal a una altura por encima o por debajo de 10, identificamos 3 y 4 clusters, respectivamente.

No podemos afirmar nada acerca del número de clusters óptimo con esta información. Habría que utilizar otros métodos, tanto visuales como matemáticos que nos permitan hacer una afirmación acerca de k un poco más rotunda.

Métodos jerárquicos aglomerativos

En esta subsección vamos a analizar los principales métodos jerárquicos aglomerativos. Hemos de aclarar que ninguno de los que presentaremos es más eficiente que otro. Esto dependerá de la naturaleza de los datos y el enfoque que tenga el análisis.

Estrategia de la distancia mínima o máxima similitud

Del inglés *single linkage*, traducido como *encadenamiento simple*, y más conocida como la estrategia del *vecino más cercano* es una estrategia que se basa en combinar dos clusters que tengan distancia mínima (o máxima similitud), siendo esta la distancia mínima entre sus componentes.

Sean C_i y C_j dos clusters cualesquiera con n_i, n_j elementos, respectivamente, y sean $x_{ik} \in C_i, x_{jm} \in C_j$, con $k = 1, \dots, n_i, m = 1, \dots, n_j$ dos elementos de dichos clusters. La distancia entre C_i y C_j viene dada por

$$d(C_i, C_j) = \min_{\substack{k=1, \dots, n_i \\ m=1, \dots, n_j}} \{d(x_{ik}, x_{jm}) \mid x_{ik} \in C_i \text{ y } x_{jm} \in C_j\}$$

donde $d(x_{ik}, x_{jm})$ es la distancia Euclídea, generalmente, o cualquier otra distancia entre los elementos x_{ik}, x_{jm} de los clusters.

Equivalentemente, en un contexto en el que usemos similitud, se unirán dos clusters C_i, C_j si

$$s(C_i, C_j) = \max_{\substack{k=1, \dots, n_i \\ m=1, \dots, n_j}} \{s(x_{ik}, x_{jm}) \mid x_{ik} \in C_i \text{ y } x_{jm} \in C_j\}$$

Estrategia de la distancia máxima o mínima similitud

Conocido también como el método del encadenamiento completo, al contrario que en la estrategia anterior, esta se basa en calcular la distancia máxima entre los clusters teniendo en cuenta la distancia máxima entre sus componentes. Esto es, ponemos el foco de atención en los elementos más dispares de los clusters, es decir, los que están a mayor distancia o son menos similares.

3 Técnicas multivariantes: fundamentos y desarrollo del análisis clúster

Sean entonces C_i y C_j dos clusters cualesquiera con n_i, n_j elementos, respectivamente y sean $x_{ik} \in C_i$, $x_{jm} \in C_j$, con $k = 1, \dots, n_i$, $m = 1, \dots, n_j$ dos elementos de dichos clusters. Entonces, la distancia entre dichos clusters viene dada por:

$$d(C_i, C_j) = \max_{\substack{k=1, \dots, n_i \\ m=1, \dots, n_j}} \{d(x_{ik}, x_{jm}) \mid x_{ik} \in C_i \text{ y } x_{jm} \in C_j\}$$

Equivalentemente, si lo miramos desde el punto de vista de la similaridad, se unirán dos clusters C_i, C_j si

$$s(C_i, C_j) = \min_{\substack{k=1, \dots, n_i \\ m=1, \dots, n_j}} \{s(x_{ik}, x_{jm}) \mid x_{ik} \in C_i \text{ y } x_{jm} \in C_j\}$$

Estrategia de la distancia o similitud promedio

Mientras que en las dos estrategias anteriores la combinación de dos clusters en uno dependía únicamente de un único par de objetos dentro de cada cluster, y se usaba la distancia máxima o mínima, la estrategia de la distancia promedio calcula la distancia entre dos clusters como el promedio de las disimilaridades en cada cluster. Dependiendo de si consideramos el tamaño de los clusters en el promedio o no, podemos distinguir entre dos estrategias diferentes: la no ponderada y la ponderada.

Consideremos en lo que sigue dos clusters C_i, C_j con n_i, n_j elementos, y x_{ik}, x_{jm} dos elementos de C_i, C_j , respectivamente con $k = 1, \dots, n_i$, $m = 1, \dots, n_j$.

- **No ponderada**

Supongamos, sin pérdida de generalidad, que C_i está constituido por dos clusters C_{i1} y C_{i2} con n_{i1}, n_{i2} elementos respectivamente, la distancia entre C_i y C_j viene dada por

$$d(C_i, C_j) = \frac{d(C_{i1}, C_j) + d(C_{i2}, C_j)}{2}$$

Observamos que esta distancia es independiente de los tamaños de los clusters involucrados. Esto quiere decir que las distancias respecto a C_j de C_{i1} y C_{i2} tienen el mismo peso.

- **Ponderada**

A diferencia de la anterior estrategia, esta distancia es el promedio ponderado de las distancias de las componentes del cluster con respecto a las del otro. Supongamos que C_i está constituido por dos clusters C_{i1}, C_{i2} con n_{i1}, n_{i2} elementos tales que $n_i = n_{i1} + n_{i2}$ y tomemos los elementos $x_{ik_1} \in C_{i1}$, $x_{ik_2} \in C_{i2}$. Entonces, la distancia promedio pondera entre C_i, C_j viene dada por

$$\begin{aligned}
 d(C_i, C_j) &= \frac{\sum_{k=1}^{n_i} \sum_{m=1}^{n_j} d(x_{ik}, x_{jm})}{n_i n_j} = \frac{1}{(n_{i1} + n_{i2}) n_j} \sum_{k=1}^{n_{i1}+n_{i2}} \sum_{m=1}^{n_j} d(x_{ik}, x_{jm}) = \\
 &= \frac{1}{(n_{i1} + n_{i2}) n_j} \sum_{k_1=1}^{n_{i1}} \sum_{m=1}^{n_j} d(x_{ik_1}, x_{jm}) + \frac{1}{(n_{i1} + n_{i2}) n_j} \sum_{k_2=1}^{n_{i2}} \sum_{m=1}^{n_j} d(x_{ik_2}, x_{jm}) = \\
 &= \frac{n_{i1}}{(n_{i1} + n_{i2}) n_j n_{i1}} \sum_{k_1=1}^{n_{i1}} \sum_{m=1}^{n_j} d(x_{ik_1}, x_{jm}) + \frac{n_{i2}}{(n_{i1} + n_{i2}) n_j n_{i2}} \sum_{k_2=1}^{n_{i2}} \sum_{m=1}^{n_j} d(x_{ik_2}, x_{jm}) = \\
 &= \frac{n_{i1}}{n_{i1} + n_{i2}} d(C_{i1}, C_j) + \frac{n_{i2}}{n_{i1} + n_{i2}} d(C_{i2}, C_j) = \\
 &= \frac{n_{i1} d(C_{i1}, j) + n_{i2} d(C_{i2}, C_j)}{n_{i1} + n_{i2}}
 \end{aligned}$$

Método del centroide

En este método, para determinar cuán semejantes son dos clusters, vamos a poner el foco de atención en los *centroides* de los mismos, es decir, en los vectores de medias de las variables observadas sobre los individuos que conforman el cluster. Entonces, los centroides de los clusters C_i, C_j son

$$\bar{x}_{ik} = \frac{\sum_{k=1}^{n_i} x_{ik}}{n_i} = \begin{bmatrix} \bar{x}_{i1} \\ \bar{x}_{i2} \\ \vdots \\ \bar{x}_{n_i} \end{bmatrix} \quad \text{y} \quad \bar{x}_{jm} = \frac{\sum_{m=1}^{n_j} x_{jm}}{n_j} = \begin{bmatrix} \bar{x}_{j1} \\ \bar{x}_{j2} \\ \vdots \\ \bar{x}_{n_j} \end{bmatrix}$$

respectivamente, y el cuadrado de la distancia Euclídea entre ambos centroides es $d^2(C_i, C_j) = \|\bar{x}_{ik} - \bar{x}_{jm}\|^2$. Se persigue entonces el objetivo de encontrar clusters que hagan mínima la distancia entre sus centroides, para, consecuentemente, combinarlos en un nuevo cluster, que llamaremos C_t con centroide $\bar{x}_{tl} = \frac{(n_i \bar{x}_{ik} + n_j \bar{x}_{jm})}{n_i + n_j}$. Se calcularían de nuevo las distancias entre dicho centroide y el de los demás clusters. Continuaríamos el proceso hasta obtener un único cluster.

3.2.6 Métodos no jerárquicos

Parte III

FUNDAMENTOS INFORMÁTICOS

Bibliography

- [1] Instituto Roche. *Informe Anticipando Ciencias Ómicas*. Último acceso: 14 de enero de 2025. 2025. URL: https://www.institutoroche.es/static/archivos/Informes_anticipando_CIENCIAS_OMICAS.pdf.
- [2] Universidad Nacional Autónoma de México. *Revista UNAM Vol. 18 Núm. 7 Artículo 54*. Último acceso: 14 de enero de 2025. 2025. URL: <https://revista.unam.mx/vol.18/num7/art54/index.html?>.
- [3] Universidad Nacional Autónoma de México. *Artículo en Revista UNAM*. Último acceso: 15 de enero de 2025. 2017. URL: https://www.revista.unam.mx/vol.18/num7/art54/PDF_art54.pdf.
- [4] Adi L. Tarca et al. *Machine Learning and Its Applications to Biology*. © 2007 Public Library of Science. 2007. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0030116>.
- [5] Trevor Hastie, Robert Tibshirani, and Jerome Friedman. *The Elements of Statistical Learning: Data Mining, Inference, and Prediction*. © 2009 Springer Science+Business Media, LLC. New York, 2009. URL: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-0-387-84858-7>.
- [6] Minoru Kanehisa et al. "KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs". In: *Nucleic Acids Research* 45.Database issue (2017). Published online 29 November 2016, pp. D353–D361. DOI: [10.1093/nar/gkw1092](https://doi.org/10.1093/nar/gkw1092). URL: <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1092>.
- [7] Hiromi W. L. Koh et al. *iOmicsPASS: network-based integration of multiomics data for predictive subnetwork discovery*. © 2021 Nature Publishing Group. 2021. URL: <https://www.nature.com/npjbsa>.
- [8] Wolfgang Huber et al. "Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor". In: *Nature Methods* 12.2 (2015), pp. 115–121. DOI: [10.1038/nmeth.3252](https://doi.org/10.1038/nmeth.3252). URL: <https://doi.org/10.1038/nmeth.3252>.
- [9] Guillermo Ayala. *Bioinformática Estadística*. Edición digital en PDF. Valencia, España, 2023.
- [10] National Human Genome Research Institute. *Tecnología de microarrays (chips de ADN o ARN)*. Último acceso: 23 de febrero de 2025. 2025. URL: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Tecnolog%C3%ADa-de-microarrays-chips-de-ADN-o-ARN>.
- [11] National Human Genome Research Institute. *Exón*. Último acceso: 23 de febrero de 2025. 2025. URL: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Exon>.

Bibliography

- [12] National Human Genome Research Institute. *Intrón*. Último acceso: 23 de febrero de 2025. 2025. URL: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Intron>.
- [13] National Human Genome Research Institute. *Expresión génica*. Último acceso: 23 de febrero de 2025. 2025. URL: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Expresion-genica>.
- [14] National Human Genome Research Institute. *Fenotipo*. Último acceso: 23 de febrero de 2025. 2025. URL: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Fenotipo>.
- [15] ZhiCheng Dong and Yan Chen. *Transcriptomics: Advances and Approaches*. Recibido el 14 de agosto de 2013; aceptado el 6 de septiembre de 2013. Guangzhou 510650, China, 2013.
- [16] Mark Gerstein Zhong Wang and Michael Snyder. *RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics*. Publicado en versión final editada en enero de 2009. Department of Molecular, Cellular et al., 2009. DOI: 10.1038/nrg2484.
- [17] Instituto Roche. *Contig*. Último acceso: 23 de febrero de 2025. 2025. URL: <https://www.institutoroche.es/recursos/glosario/contig>.
- [18] Your Genome. *What is RNA Splicing?* Último acceso: 23 de febrero de 2025. 2025. URL: <https://www.yourgenome.org/theme/what-is-rna-splicing/>.
- [19] Ali Mortazavi et al. *Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq*. © 2008 Nature Publishing Group. 2008. URL: <http://www.nature.com/naturemethods>.
- [20] Mark D. Robinson Alicia Oshlack and Matthew D. Young. *From RNA-seq reads to differential expression results*. REVIEW. 2010. URL: <http://genomebiology.com/2010/11/12/220>.
- [21] Ashraful Haque et al. *A practical guide to single-cell RNA-sequencing for biomedical research and clinical applications*. REVIEW, Open Access. 2017. DOI: 10.1186/s13073-017-0467-4.
- [22] Dragomirka Jovic et al. *Single-cell RNA sequencing technologies and applications: A brief overview*. REVIEW, Recibido: 5 de agosto de 2021; Revisado: 9 de diciembre de 2021; Aceptado: 20 de diciembre de 2021. 2021. DOI: 10.1002/ctm2.694.
- [23] Broad Institute. *Processing Single-Cell RNA-Seq Data*. Último acceso: 23 de febrero de 2025. 2019. URL: https://broadinstitute.github.io/2019_scWorkshop/processing-scrnaseq-data.html.
- [24] C. Radhakrishna Rao. *Multivariate Analysis: Some Reminiscences on Its Origin and Development*. 1983. URL: <https://www.jstor.org/stable/25052296>.
- [25] Mushtak A.K. Shiker. *Multivariate Statistical Analysis*. 2012. URL: <https://www.britishjournalofscience.com>.

Bibliography

- [26] Alvin C. Rencher and William F. Christensen. *Methods of Multivariate Analysis*. 3rd. Wiley Series in Probability and Statistics. Editors: David J. Balding, Noel A. C. Cressie, Garrett M. Fitzmaurice, Harvey Goldstein, Iain M. Johnstone, Geert Molenberghs, David W. Scott, Adrian F. M. Smith, Ruey S. Tsay, Sanford Weisberg. Provo, Utah: John Wiley Sons, Inc., 2012.
- [27] José Luis Romero Béjar and Carlos Francisco Salto Díaz. *Tema 3.- Análisis de componentes principales (ACP)*. Asignatura: Estadística Multivariante (Prácticas). Grados en: Física y Matemáticas; Ingeniería Informática y Matemáticas; Matemáticas (4º Curso - 1er semestre 2023-2024). 2023. URL: <https://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/85857/ACP.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- [28] José Luis Romero Béjar and Carlos Francisco Salto Díaz. *Tema 4.- Análisis factorial (AF)*. Asignatura: Estadística Multivariante (Prácticas). Grados en: Física y Matemáticas; Ingeniería Informática y Matemáticas; Matemáticas (4º Curso - 1er semestre 2023-2024). 2023. URL: <https://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/85859/AF.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- [29] Neil H. Timm. *Applied Multivariate Analysis*. Primera edición. 2002.
- [30] Wolfgang Karl Härdle and Léopold Simar. *Applied Multivariate Statistical Analysis*. Library of Congress Control Number: 2015933294. 2015. DOI: [10.1007/978-3-662-45171-7](https://doi.org/10.1007/978-3-662-45171-7).
- [31] Brian S. Everitt et al. *Cluster Analysis*. Quinta edición. 2011.
- [32] José Luis Romero Béjar and Carlos Francisco Salto Díaz. *Tema 6.- Análisis cluster (AC)*. Material protegido por la Licencia Creative Commons CC BY-NC-ND. 2023. URL: <https://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/85861/AC.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- [33] Usuario de Stack Overflow. *Adding labels to cluster*. Pregunta y respuestas en la plataforma Stack Overflow. 2018. URL: <https://stackoverflow.com/questions/50107157/adding-labels-to-cluster>.
- [34] Anil K. Jain and Richard C. Dubes. *Algorithms for Clustering Data*. Primera edición. 1988.
- [35] Rafael Payá Albert. *Definición de norma*. Material de Análisis I. 2014-2015. URL: <https://www.ugr.es/~rpaya/documentos/AnalisisI/2014-15/Normados.pdf>.
- [36] Universidad de Granada. *Técnicas de clustering y la métrica de Mahalanobis*. Material de estudio sobre clustering. 2025. URL: <https://www.ugr.es/~gallardo/pdf/cluster-2.pdf>.