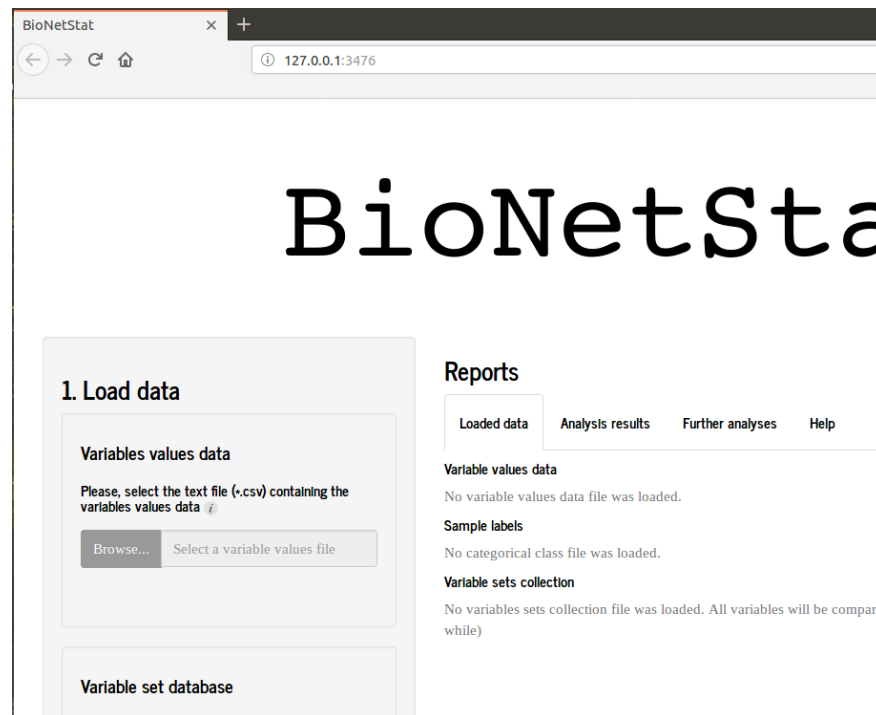


BioNetStat user interface tutorial

Being R and BioNetStat installed, as showed in README, you have just open R and run the following commands.

```
library(devtools)
library(shiny)
library(BioNetStat)
runGitHub("jardimViniciusC/BioNetStat",subdir = "inst/shiny")
```

First screen



When you start BioNetStat you will see this image.

Caso você esteja usando o Rstudio uma janela alternativa será aberta, o BNS funcionará de maneira mais eficiente se for usado no browser do seu navegador, por isso clique em “open in browser” na esquerda superior da tela e o BNS será inicia no navegador como na primeira figura. *Image of BioNetStat_rstudio*

Carregando os arquivos

Ao clicar no icone ‘Browse..’ da seção 1(Load data) uma janela se abrirá para que a tabela de valores de variáveis seja selecionada. *data_selection*

Neste tutorial o arquivo a ser selecionado é o `bnsDataTest_log2.csv`. O arquivo será carregado e o programa irá identificar as colunas que são classificadas como ‘numeric’ pelo R. Uma visão prévia da tabela inserida irá aparecer na sua tela. Além disso, uma seção ‘Factors’ reconhecerá quais as colunas são classificadas como ‘factor’ pelo R. Nessa seção é possível selecionar os fatores que serão usados para selecionar os estados (tratamentos, condições) comparados. A seleção dos estados pode ser feita em ‘Choose the conditions to be compared:’

Image of BioNetStatFactors

Após a seleção da tabela de valores de variáveis, é possível carregar o arquivo ‘grupo de variáveis’ (opcional) em ‘Variable set database’. Em nosso tutorial o arquivo selecionado pode ser `c2.cp.v5.2.symbols.gmt` que define os grupos de variáveis de acordo com as vias gênicas as quais elas estão associadas. Caso o usuário não carregue nenhum arquivo, o programa irá comparar as redes com todas as variáveis carregadas no arquivo ‘Variables values data’

Image of BioNetStatFiles

Selecionando os parâmetros

Com todos os arquivos de entrada já carregados é necessário escolher os parâmetros utilizados para comparar as redes: 1. Número mínimo e máximo de variáveis (nós) que estarão nas redes comparadas em ‘Variable sets size range’. O programa retorna a quantidade de conjuntos de variáveis que estão entre esses valores (figura acima). 2. Medida de dependência usada para inferir a rede de correlação. 3. Força de associação que será usada como limiar para a formação de uma aresta entre dois nós e qual o valor de limiar usado. 4. Tipo de rede que será construída, com ou sem peso nas arestas. No caso de redes com peso, qual a medida de associação será usada como peso das arestas.

Image of BioNetStatNetParameters

5. Método de comparação das redes. Se o usuário escolher comparar as redes pelas distribuições do espectro ou de grau ele deve selecionar qual medida de largura de banda será usada em ‘Bandwidth’, podendo ser ‘Silverman’ ou ‘Sturges’.
6. Numero de permutações e se será usada uma semente para os testes de permutação aleatória.

Image of BioNetStatNet2Parameters

Rodando a análise diferencial de múltiplas redes

Após carregar os arquivos e selecionar os parâmetros de análise, clique em ‘Start analysis’ para realizar a comparação das redes.

Image of BioNetStatrunning

Resultados

1. Enquanto a análise é realizada, o programa mostrará essa imagem: *Image of BioNetStatwaiting*
2. Quando a análise tiver terminado o programa mostrará os parâmetros usados para realizar a análise. *Image of BioNetStatres1*
3. A tabela final é apresentada como na figura a seguir: *Image of BioNetStatres2*

Análise diferencial de vértices

4. É possível também realizar a comparação da importância dos vértices. Na aba ‘Further analysis’ é possível selecionar os grupos de variáveis de acordo com seu critério de corte. O grupo de variáveis é escolhido e o programa irá gerar a comparação de vértices pela centralidade de grau.

Image of BioNetStatresVert1

5. Quando a tabela aparece, é possível selecionar outras propriedades estruturais para comparar os vértices dos grafos. A tabela resultante da análise diferencial de vértices é mostrada como na figura a seguir.

Image of BioNetStatresVert2

6. Outra funcionalidade disponível é observar as variáveis em vias metabólicas do banco de dados KEGG, o que nos permitire conhecer mais a fundo as vias metabólicas que as variáveis estudadas estão inseridas. A aba “KEGG pathway visualization”, em “*Image of BioNetStatresVert2*

é preciso inserir uma tabela que contem duas colunas, onde na primeira deve estar os nomes das variáveis que você está estudando e na segunda o respectivo código KEGG dessas variáveis. Esses códigos podem ser encontrados no próprio site do KEGG. Além da tabela com os códigos das variáveis deverá ser informado a cor usada na construção do gráfico, se as variáveis estudadas são genes/proteínas ou metabólitos. As variáveis que irão aparecer na figura são as mesmas analisadas na tabela de análise diferencial do vértice e elas podem ser filtradas ou de acordo com o valor do teste ou o pvalor ou o qvalor associado a ele. É necessário que se escolha qual via metabólica será usada para produzir a visualização e em qual especie.

Image of BioNetStatresVert5.

No mapa KEGG, você observará um que os retângulos ou os círculos estão divididos em colunas, representando os tratamentos que você escolheu comparar. A intensidade das cores é relativa aos valores de centralidades escolhidos conforme a legenda. a seguir um exemplo de um mapa construído com genes da via “pathway in cancer” (05200) do kegg, para humanos (“hsa”).

Image of BioNetStatresVert5.

Image of BioNetStatresVert6

Ao clicar no botão para salvar é necessário esperar para que o programa faça o download do mapa, salve-o no diretório “Downloads” em um arquivo compactado. A visualização se encontra dentro do arquivo compactado.

Image of BioNetStatresVert7.

Visualização das redes

A visualização das redes nos ajuda a compreender as mudanças dos padrões de maneira mais fácil. Essa visualização pode ser feita de diversas maneiras e algumas delas estão disponíveis no BioNetStat na aba “Network visualization plots”. Como diversos estados podem ser comparados pelo BNS nesta seção é necessário escolher apenas dois deles para serem visualizados e comparados por vez.

Image of BioNetStatclassSelection

A primeira forma de visualizar as redes é em forma de heatmaps das matrizes de adjacência (matriz que representa a rede). inicialmente o usuário pode escolher os parametros (cor, formato e tamanho) para a construção da figura. *Image of BioNetStatplotSettings*

7. E então pode visualizar as redes dos estados selecionados. *Image of BioNetStatplotSettings*
8. É possível o usuário comparar a associação entre pares de variáveis escolhidas nos tratamentos analisados: *Image of BioNetStatplotSettings*
9. As redes produzidas podem ser comparadas através de propriedades estruturais globais como entropia espectral da rede ou centralidade de grau média: *Image of BioNetStatplotSettings*
10. A matriz de diferenças permite analisar para todos os pares de variáveis como sua relação muda entre os estados. *Image of BioNetStatplotSettings*
11. A lista de associação entre as variáveis no permite ter uma ideia mais precisa das diferenças entre as forças de associação nos dois estados. *Image of BioNetStatplotSettings*
12. Por fim, a rede pode ser exportada para o programa de integração de níveis biológicos S.I.T. (System Integration Tool) onde a rede pode ser visualizadas e manipulada. *Image of BioNetStatplotSettings*

Estudo o comportamento das variáveis

O BioNetStat disponibiliza também um estudo do comportamento das variáveis para que o usuário possa ter uma visão completa do seu objeto de estudo. 1. Inicialmente as variáveis podem ser exploradas por meio da construção de um heatmap onde os parametros da figura são selecionados. *Image of BioNetStatplotSettings* e o heatmap é produzido. Nas colunas estão as amostras com as cores indicando à qual estado cada amostra pertence. É possível agrupar tanto as colunas (amostras) quanto as linhas (variáveis) do heatmap na seção “heatmap cluster options” na figura acima. *Image of BioNetStatplotSettings*

2. Nos mapas do banco de dados KEGG, podemos observar também as expressões do genes, concentrações da proteínas e dos metabólitos. Em “KEGG pathway visualization” o usuário deve inserir o código das variáveis, uma tabela que contem duas colunas, onde na primeira deve estar os nomes das variáveis que você está estudando e na segunda o respectivo código KEGG dessas variáveis. Esses códigos podem ser encontrados no próprio site do KEGG. As variáveis que irão aparecer na figura são as mesmas analisadas na tabela de análise diferencial do vértice e elas podem ser filtradas ou de acordo com o valor do teste ou o pvalor ou o qvalor associado a ele. Na figura será mostrado um valor que representará todas as amostras de cada estado, que pode ser a média, a mediana, o mínimo ou o máximo. É necessário que se escolha qual via metabólica será usada para produzir a visualização e em qual especie.

Image of BioNetStatresVert5. Image of BioNetStatresVert5.

No mapa KEGG, você observará um que os retangulos ou os círculos estão divididos em colunas, representando os tratamentos que você escolheu comparar. A intensidade das cores é relativa aos valores de centralidades escolhidos conforme a legenda. a seguir um exemplo de um mapa construido com genes da via “pathway in cancer” (05200) do kegg, para humanos (“hsa”). *Image of BioNetStatresVert5. Image of BioNetStatresVert6* Ao clicar no botão para salvar é necessário esperar para que o programa faça o donwload do mapa, salve-o no diretório “Downloads” em um arquivo compactado. A visualização se encontra dentro do arquivo compactado. *Image of BioNetStatresVert7.*

3. O BioNetStat disponibiliza a realização de um teste estatístico para verificar a mudança no comportamento das variáveis entre os estados (teste t, para dois estados, e ANOVA, para mais de dois, com os respectivos testes não paramétricos). Os resultados so apresentados na tabela como a seguir:

Image of BioNetStatresVert7.

4. Por fim, a última análise disponível no BioNetStat é a visualização dos valores de uma determinada variável em um grafico boxplot. Onde inicialmente o usuário deve escolher os parametros da figura formada

Image of BioNetStatresVert7.

e posteriormente a variável que será visualizada.

Image of BioNetStatresVert7.