

PEC1 Análisis de Datos Ómicos

Carmen Almudena Navarro Andrés

2024-11-02

Contents

RESUMEN	1
OBJETIVOS DEL ESTUDIO	2
MATERIALES Y MÉTODOS	2
Diseño del estudio	2
Análisis metabolómico	2
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	3
Creación del contenedor SummarizedExperiment	3
Análisis exploratorio de datos	6
Link del repositorio de github:	18

RESUMEN

Este trabajo emplea el análisis de datos metabolómicos para estudiar los cambios en la expresión de metabolitos en la orina y sangre de mujeres sanas de entre 21 y 29 años tras beber zumo de manzana y zumo de arándano rojo, ambos ricos en procianidinas.

Los datos metabolómicos fueron organizados en un objeto de tipo SummarizedExperiment, y posteriormente se llevó a cabo un análisis exploratorio de datos (EDA). Este incluyó métodos de visualización como gráficos de densidad, PCA, volcano plots y heatmaps, así como pruebas como el t-test para la identificación de metabolitos diferencialmente expresados entre los tratamientos.

En cuanto a la expresión metabolómica global, apenas se observaron cambios entre los grupos. Sin embargo, sí que hubo diferencias significativas entre los grupos en varios metabolitos. Estos metabolitos diferencialmente expresados podrían ser indicativos de la respuesta metabólica específica a los compuestos presentes en la manzana y arándano rojo. Los resultados de este análisis podrían proporcionar una base para futuras investigaciones sobre los efectos de las procianidinas en el metabolismo humano y posibles beneficios de estas para la salud.

OBJETIVOS DEL ESTUDIO

El objetivo principal de este estudio fue analizar los cambios metabolómicos en mujeres jóvenes sanas inducidos por el consumo de zumo de arándanos y manzana. Para alcanzar este objetivo, el estudio se centró en:

1. Evaluar las variaciones en los perfiles metabólicos de la orina y plasma después del consumo de zumo de arándano rojo y zumo de manzana en comparación con los valores basales.
2. Identificar metabolitos específicos que respondan diferencialmente al consumo de arándano rojo o manzana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Se seleccionaron 18 mujeres sanas en etapa universitaria, de entre 21 y 29 años, con un índice de masa corporal de 18.5 a 25. A cada paciente se le proporcionó una lista de alimentos ricos en procianidinas que debían evitar durante el estudio (arándanos, manzanas, uvas, chocolate, y ciruelas). Finalmente, se excluyeron a 3 participantes del experimento por errores al seguir el protocolo.

El día 7 tras comenzar la dieta pobre en procianidinas, después de un ayuno nocturno, se recolectaron muestras de orina y sangre en ayunas como valores basales. Posteriormente, las participantes fueron asignadas aleatoriamente a dos grupos: el grupo de zumo de arándano y el grupo de zumo de manzana (9 participantes en cada grupo). A cada participante se le proporcionaron 6 botellas de zumo (de 250 mL cada una) que debían consumir entre el día 7 y 9. Luego, en el día 10 se extrajeron las muestras de sangre y orina. Tras un período de lavado de dos semanas, los grupos intercambiaron los tratamientos y el protocolo se repitió. Todas las muestras de plasma y orina se almacenaron a -80°C hasta el momento del análisis.

Análisis metabolómico

Para evaluar los perfiles metabolómicos en plasma y orina, se empleó la cromatografía líquida con espectrometría de masas (LCMS).

Estos datos se descargaron del repositorio de GitHub metaboData (<https://github.com/nutrimetabolomics/metaboData/>), divididos en los archivos features.csv, que incluía columnas con el ID de las participantes y filas con el ID de PubChem del metabolito, con sus respectivos valores cuantitativos; metaboliteNames.csv, con el nombre del metabolito, además de su ID de PubChem y su ID de KEGG; y metadata.csv, que incluía el ID del paciente y su tratamiento. La información sobre el dataset y el estudio se encontró en la página web www.metabolomicsworkbench.org, a partir del ID del estudio indicado en el repositorio.

En primer lugar, se generó un objeto del tipo SummarizedExperiment a partir de estos datos, y luego se procedió a realizar el análisis exploratorio de datos. Este incluyó un resumen estadístico de los metabolitos por grupo de tratamiento, una representación de la distribución de los niveles de expresión por tratamiento con un gráfico de densidad, un análisis de componentes principales (PCA), un análisis de expresión diferencial de metabolitos con t-test y volcano plot; y un heatmap y agrupación jerárquica de los metabolitos expresados diferencialmente en las muestras de tratamiento con zumo de manzana y zumo de arándano, para observar las diferencias en su expresión y agruparlos en función de su similitud.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Creación del contenedor SummarizedExperiment

Primero vamos a cargar nuestros datos para proceder a construir el contenedor del tipo SummarizedExperiment

```
#Configuramos el directorio de trabajo y cargamos los 3 archivos
setwd("C:/Users/carne/OneDrive/Documents/Análisis de datos ómicos/PEC1")
features <- read.csv("features.csv", sep= ";")
metabolite_names <- read.csv("metaboliteNames.csv", sep=";")
metadata <- read.csv("metadata.csv", sep= ";")
# Visualizamos los datos
View(features)
View(metabolite_names)
View(metadata)
```

Ahora vamos a comprobar que los nombres de los IDs en metadata coincidan con los nombres de las columnas en features para poder crear el objeto SummarizedExperiment

```
metadata_ids <- metadata$ID
feature_columns <- colnames(features)
stopifnot(metadata_ids == feature_columns)

# Transponemos features para que las filas representen muestras y las columnas representen metabolitos

features <- t(features)

# Reordenamos metadata para que coincida con las filas de features, ya que las muestras deben estar en

metadata <- metadata[match(rownames(features), metadata$ID), ]

# Verificamos que los nombres de las filas de features coincidan con los IDs de metadata

stopifnot(rownames(features) == metadata$ID)

# Reordenamos metabolite_names para que coincida con las columnas de features

metabolite_names <- metabolite_names[match(colnames(features), metabolite_names$PubChem), ]
stopifnot(colnames(features) == metabolite_names$PubChem)
#https://uclouvain-cbio.github.io/bioinfo-training-02-rnaseq/summarizedexperiments.html

# Cargamos el paquete Summarized Experiment
library(SummarizedExperiment)
```

```
## Loading required package: MatrixGenerics
```

```
## Loading required package: matrixStats
```

```
##
```

```
## Attaching package: 'MatrixGenerics'
```

```

## The following objects are masked from 'package:matrixStats':
##
##   colAlls, colAnyNAs, colAnys, colAvgPerRowSet, colCollapse,
##   colCounts, colCummaxs, colCummins, colCumprods, colCumsums,
##   colDiffs, colIQRDiffs, colIQRs, colLogSumExps, colMadDiffs,
##   colMads, colMaxs, colMeans2, colMedians, colMins, colOrderStats,
##   colProds, colQuantiles, colRanges, colRanks, colSdDiffs, colSds,
##   colSums2, colTabulates, colVarDiffs, colVars, colWeightedMads,
##   colWeightedMeans, colWeightedMedians, colWeightedSds,
##   colWeightedVars, rowAlls, rowAnyNAs, rowAnys, rowAvgPerColSet,
##   rowCollapse, rowCounts, rowCummaxs, rowCummins, rowCumprods,
##   rowCumsums, rowDiffs, rowIQRDiffs, rowIQRs, rowLogSumExps,
##   rowMadDiffs, rowMads, rowMaxs, rowMeans2, rowMedians, rowMins,
##   rowOrderStats, rowProds, rowQuantiles, rowRanges, rowRanks,
##   rowSdDiffs, rowSds, rowSums2, rowTabulates, rowVarDiffs, rowVars,
##   rowWeightedMads, rowWeightedMeans, rowWeightedMedians,
##   rowWeightedSds, rowWeightedVars

## Loading required package: GenomicRanges

## Loading required package: stats4

## Loading required package: BiocGenerics

##
## Attaching package: 'BiocGenerics'

## The following objects are masked from 'package:stats':
##
##   IQR, mad, sd, var, xtabs

## The following objects are masked from 'package:base':
##
##   anyDuplicated, aperm, append, as.data.frame, basename, cbind,
##   colnames, dirname, do.call, duplicated, eval, evalq, Filter, Find,
##   get, grep, grepl, intersect, is.unsorted, lapply, Map, mapply,
##   match, mget, order, paste, pmax, pmax.int, pmin, pmin.int,
##   Position, rank, rbind, Reduce, rownames, sapply, setdiff, table,
##   tapply, union, unique, unsplit, which.max, which.min

## Loading required package: S4Vectors

##
## Attaching package: 'S4Vectors'

## The following object is masked from 'package:utils':
##
##   findMatches

## The following objects are masked from 'package:base':
##
##   expand.grid, I, unname

```

```
## Loading required package: IRanges

##
## Attaching package: 'IRanges'

## The following object is masked from 'package:grDevices':
##
##     windows

## Loading required package: GenomeInfoDb

## Loading required package: Biobase

## Welcome to Bioconductor
##
##     Vignettes contain introductory material; view with
##     'browseVignettes()'. To cite Bioconductor, see
##     'citation("Biobase)"', and for packages 'citation("pkgname)"'.

##
## Attaching package: 'Biobase'

## The following object is masked from 'package:MatrixGenerics':
##
##     rowMedians

## The following objects are masked from 'package:matrixStats':
##
##     anyMissing, rowMedians
```

```
# Convertimos features en una matriz (lo volvemos a transponer)
features <- t(features)
assay_data <- as.matrix(features)

# Usamos el ID de PubChem como nombre de fila en metabolite_info, para que coincida con el nombre de fi
metabolite_info <- DataFrame(metabolite_names)
rownames(metabolite_info) <- metabolite_info$PubChem

# Usamos el ID como nombre de fila en metadata para que coincida con el nombre de columna en featuress
colData <- DataFrame(metadata)
rownames(colData) <- colData$ID

# Ahora construimos el objeto de SummarizedExperiment
se <- SummarizedExperiment(
  assays = list(counts = assay_data),
  rowData = metabolite_info,
  colData = colData
)

se
```

```
## class: SummarizedExperiment
## dim: 1541 45
## metadata(0):
## assays(1): counts
## rownames(1541): 443489 107754 ... 53297445 11954209
## rowData names(3): names PubChem KEGG
## colnames(45): b1 b10 ... c8 c9
## colData names(2): ID Treatment
```

assays contiene los datos metabólicos numéricos, rowData la información sobre los metabolitos y colData la información sobre la muestra y los tratamientos.

```
#Guardamos el objeto SummarizedExperiment en formato binario
save(se, file = "summarized_experiment.rda")
```

Análisis exploratorio de datos

Ahora procedemos a realizar el análisis exploratorio de datos. Como hay varias filas exclusivamente con valores NA, procedemos a eliminarlas para que no afecten nuestra exploración de los datos.

Estadística descriptiva

```
# Primero extraemos los datos metabólicos y el tipo de tratamiento de cada muestra
assay_data <- assay(se)
assay_data <- assay_data[complete.cases(assay_data), ]
treatment <- as.character(colData(se)$Treatment)

# Partimos nuestros datos según el tratamiento
baseline_data <- assay_data[, treatment == "Baseline"]
apple_data <- assay_data[, treatment == "Apple"]
cranberry_data <- assay_data[, treatment == "Cranberry"]

# Creamos un dataframe con la media, mediana y varianza de cada metabolito, y ordenamos de mayor a menor

# Comenzamos con los datos basales
baseline_stats<-data.frame(
  Metabolite = rownames(baseline_data),
  Mean = rowMeans(baseline_data),
  Median = apply(baseline_data, 1, median),
  Variance = apply(baseline_data, 1, var)
)
baseline_stats$Metabolite_Name <- rowData(se)$names[match(baseline_stats$Metabolite, rownames(rowData(se)))]
baseline_stats <- baseline_stats[order(-baseline_stats$Mean), ]
head(baseline_stats)
```

```
##           Metabolite           Mean   Median   Variance
## 588                588 14511333333 1.43e+10 3.627603e+19
## 5462194          5462194 1915200000 1.56e+09 1.921681e+18
## 464                464 1568180000 1.30e+09 3.550610e+18
## 586                586 1149466667 1.03e+09 1.150163e+18
```

```
## 1175          1175    972933333 9.58e+08 9.171407e+16
## 4784          4784    805666667 8.67e+08 2.533297e+17
##                               Metabolite_Name
## 588                               CREATININE_1
## 5462194 (E)-4-(Trimethylammonio)but-2-enoate
## 464                               Hippurate
## 586                               CREATINE
## 1175                               URATE
## 4784          Phenylmethanesulfonyl fluoride_1
```

Realizamos el mismo procedimiento con el grupo de zumo de manzana.

```
apple_stats <- data.frame(
  Metabolite = rownames(apple_data),
  Mean = rowMeans(apple_data),
  Median = apply(apple_data, 1, median),
  Variance = apply(apple_data, 1, var)
)
apple_stats$Metabolite_Name <- rowData(se)$names[match(apple_stats$Metabolite, rownames(rowData(se)))]
apple_stats <- apple_stats[order(-apple_stats$Mean), ]
head(apple_stats)
```

```
##           Metabolite           Mean  Median  Variance
## 588             588 12884000000 1.21e+10 4.407188e+19
## 464             464 1675000000 1.88e+09 1.308273e+18
## 5462194    5462194 1244133333 8.40e+08 1.027995e+18
## 1175             1175 881266667 8.85e+08 6.995864e+16
## 586             586 727533333 4.99e+08 5.209690e+17
## 227             227 588886667 4.07e+08 1.958853e+17
##                               Metabolite_Name
## 588                               CREATININE_1
## 464                               Hippurate
## 5462194 (E)-4-(Trimethylammonio)but-2-enoate
## 1175                               URATE
## 586                               CREATINE
## 227                               Anthranilate
```

Realizamos el mismo procedimiento con el grupo de zumo de arándano rojo.

```
cranberry_stats <- data.frame(
  Metabolite = rownames(cranberry_data),
  Mean = rowMeans(cranberry_data),
  Median = apply(cranberry_data, 1, median),
  Variance = apply(cranberry_data, 1, var)
)
cranberry_stats$Metabolite_Name <- rowData(se)$names[match(cranberry_stats$Metabolite, rownames(rowData(se)))]
cranberry_stats <- cranberry_stats[order(-cranberry_stats$Mean), ]
head(cranberry_stats)
```

```
##           Metabolite           Mean  Median  Variance
## 588             588 1359133333 1.12e+10 3.349554e+19
## 464             464 7191600000 5.32e+09 3.357908e+19
## 5462194    5462194 1793733333 1.26e+09 1.310448e+18
## 1175             1175 1016066667 1.13e+09 8.044492e+16
## 4784             4784 735866667 5.40e+08 1.616436e+17
```

```
## 586          586    635500000 5.86e+08 3.050248e+17
##                               Metabolite_Name
## 588                               CREATININE_1
## 464                               Hippurate
## 5462194 (E)-4-(Trimethylammonio)but-2-enoate
## 1175                               URATE
## 4784      Phenylmethanesulfonyl fluoride_1
## 586                               CREATINE
```

Gráfico de densidad de la expresión global de metabolitos

Vamos a realizar ahora un gráfico de densidad para estudiar la distribución de la expresión de metabolitos por grupo de tratamientos, para analizar las diferencias entre grupos. Realizamos la transformación logarítmica de los datos para reducir la asimetría en los valores.

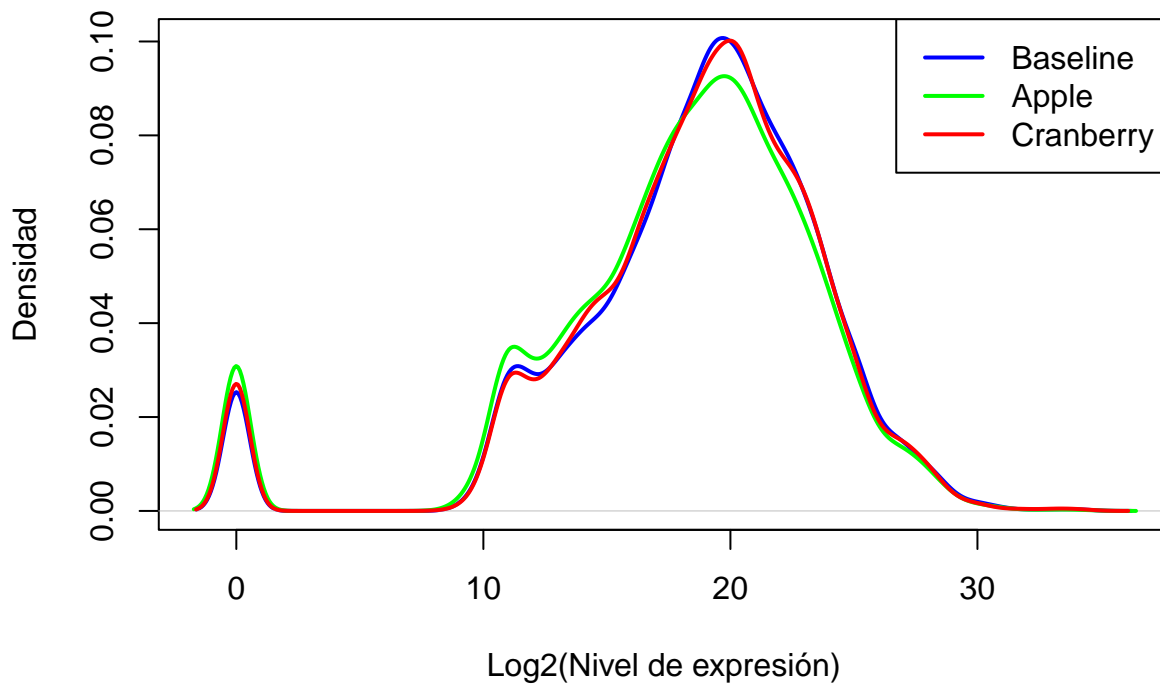
```
# Transformación logarítmica de los datos
log_assay_data <- log2(assay_data + 1)

baseline_values <- as.vector(log_assay_data[, treatment == "Baseline"])
apple_values <- as.vector(log_assay_data[, treatment == "Apple"])
cranberry_values <- as.vector(log_assay_data[, treatment == "Cranberry"])

baseline_density <- density(baseline_values, na.rm = TRUE)
apple_density <- density(apple_values, na.rm = TRUE)
cranberry_density <- density(cranberry_values, na.rm = TRUE)

# Realizamos el gráfico de densidad
plot(baseline_density, main = "Gráfico de densidad de la expresión de metabolitos por tratamiento",
     xlab = "Log2(Nivel de expresión)", ylab = "Densidad", col = "blue", lwd = 2,
     ylim = range(0, max(baseline_density$y, apple_density$y, cranberry_density$y)))
lines(apple_density, col = "green", lwd = 2)
lines(cranberry_density, col = "red", lwd = 2)
legend("topright", legend = c("Baseline", "Apple", "Cranberry"),
     col = c("blue", "green", "red"), lwd = 2)
```


Gráfico de densidad de la expresión de metabolitos por tratamiento



Podemos ver que las curvas de densidad son muy parecidas, lo que indica que la distribución de los niveles de expresión global de metabolitos es comparable en los tres grupos, por lo que los tratamientos no provocaron un gran cambio a nivel global. Los picos en las curvas podrían representar grupos de metabolitos con niveles de expresión similares, por lo que podrían pertenecer a la misma clase o estar relacionados de alguna forma. Los cambios en la expresión parecen estar reservados a ciertos metabolitos.

Análisis de componentes principales

Ahora realizamos el Análisis de Componentes Principales (PCA) para reducir las dimensiones de los datos

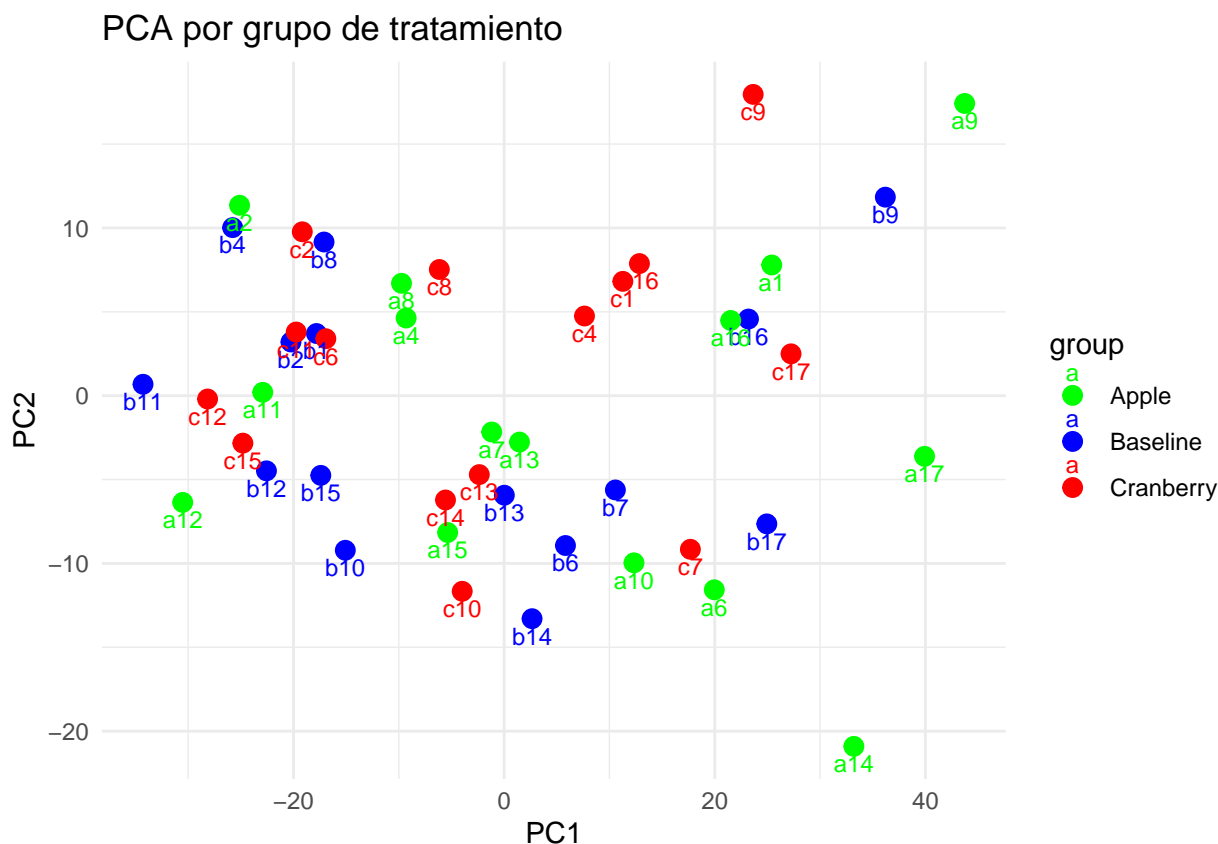
```
# Escalamos los datos
# Transponemos los datos ya que scale() trabaja por defecto por columnas, luego volvemos a transponer
assay_data_scaled <- t(scale(t(log_assay_data)))

#Realizamos el PCA
pca_results <- prcomp(t(assay_data_scaled), scale. = TRUE)
groups <- colData(se)$Treatment
pca_data <- as.data.frame(pca_results$x)
pca_data$sample <- colnames(assay_data)
pca_data$group <- groups

# Seleccionamos los 2 componentes principales para hacer el gráfico
library(ggplot2)

ggplot(pca_data, aes(x = PC1, y = PC2, color = group, label = sample)) +
  geom_point(size = 3) +
  geom_text(vjust = 1.5, size = 3) +
  labs(title = "PCA por grupo de tratamiento", x = "PC1", y = "PC2") +
  theme_minimal() +
```

```
scale_color_manual(values = c("green", "blue", "red"))
```



No se ve una agrupación o clustering clara por grupos, más bien se solapan. Esto indica que los perfiles globales de metabolitos de estos grupos son bastante similares, al menos en las dimensiones capturadas por PC1 y PC2.

Metabolitos expresados diferencialmente

Ahora realizamos el t-test, lo realizaremos por grupos de dos a dos.

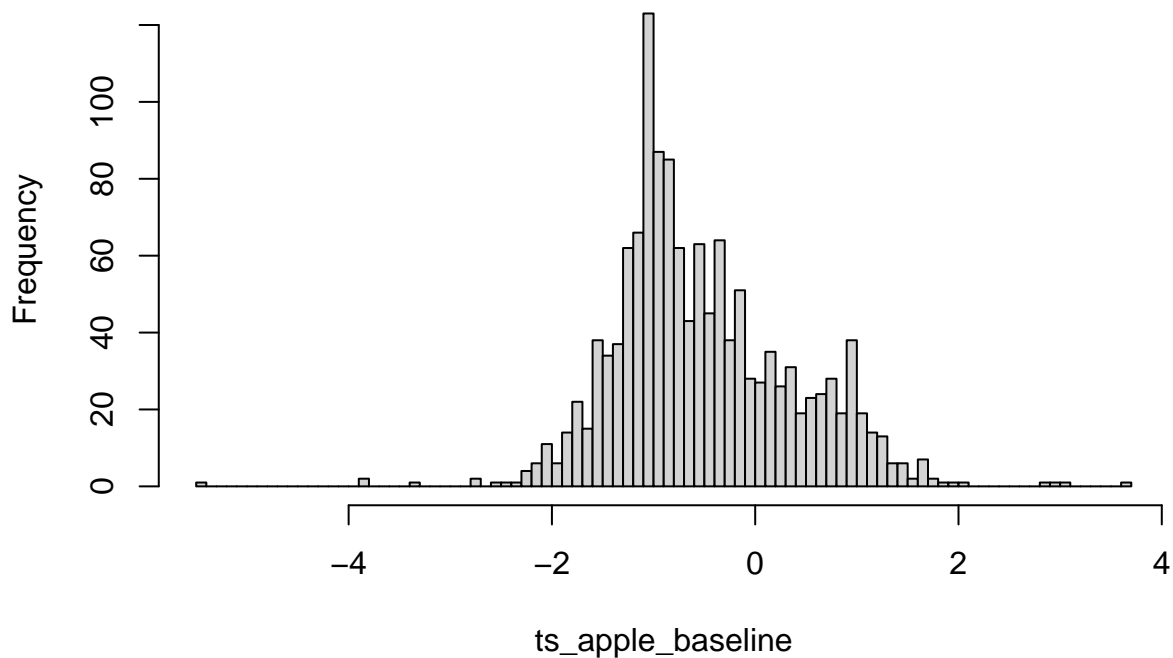
```
#https://aspteaching.github.io/Analisis_de_datos_omicos-Ejemplo_0-Microarrays/ExploreArrays.html
group_baseline <- which(treatment == "Baseline")
group_apple <- which(treatment == "Apple")
group_cranberry <- which(treatment == "Cranberry")

# Creamos nuestra función para realizar el t-test entre dos grupos
ttest <- function(x, group1, group2) {
  tt <- t.test(x[group1], x[group2])
  return(c(tt$statistic, tt$p.value, tt$estimate[1] - tt$estimate[2]))
}

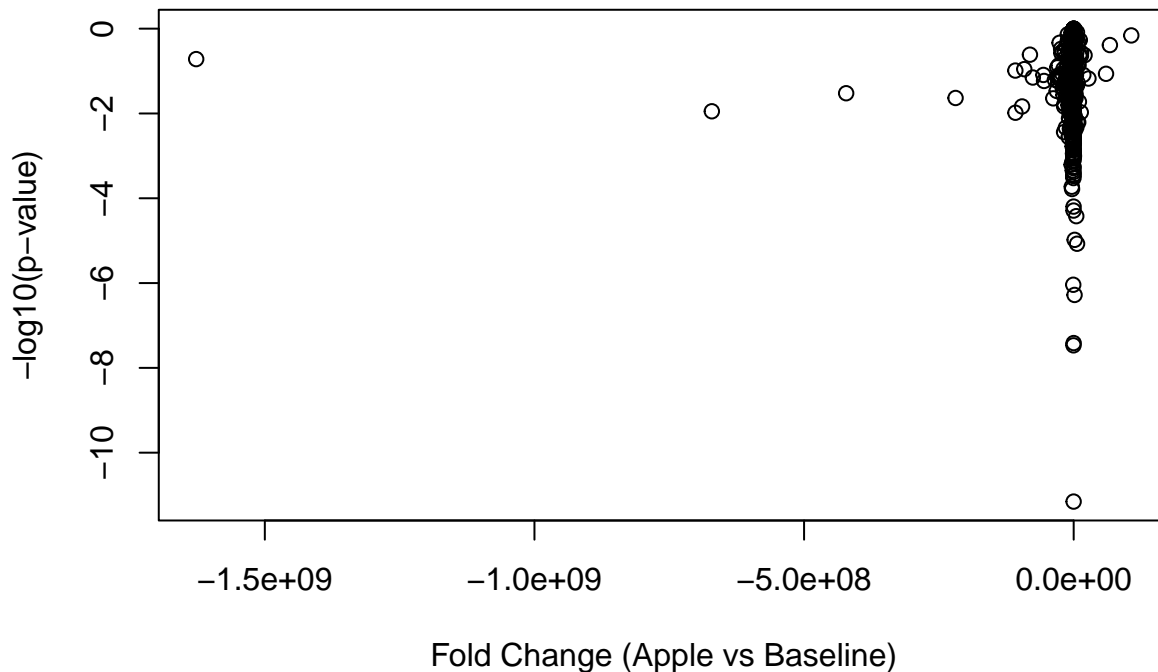
# Probamos nuestra función ttest con el grupo baseline y apple.
ans_apple_baseline <- apply(assay_data, 1, function(x) ttest(x, group_apple, group_baseline))
ts_apple_baseline <- ans_apple_baseline[1, ]
pvals_apple_baseline <- ans_apple_baseline[2, ]
fc_apple_baseline <- ans_apple_baseline[3, ]
```

```
# Creamos un histograma de los estadísticos t  
hist(ts_apple_baseline, breaks=100)
```

Histogram of ts_apple_baseline



```
#https://www.htgmolecular.com/blog/2022-08-25/understanding-volcano-plots  
# Realizamos el volcano plot  
plot(fc_apple_baseline, log(pvals_apple_baseline),  
      xlab = "Fold Change (Apple vs Baseline)",  
      ylab = "-log10(p-value)")
```



```
# Establecemos el umbral como 0.01 para centrarnos en menos metabolitos, adoptamos un enfoque más conservador
pval_threshold <- 0.01
# Filtramos los índices de los metabolitos con los pvalores que buscamos
significant_indices <- which(pvals_apple_baseline < pval_threshold)

# Obtenemos los nombres de los metabolitos y sus p-valores
significant_metabolite_names <- rowData(se)$names[significant_indices]
significant_pvalues <- pvals_apple_baseline[significant_indices]

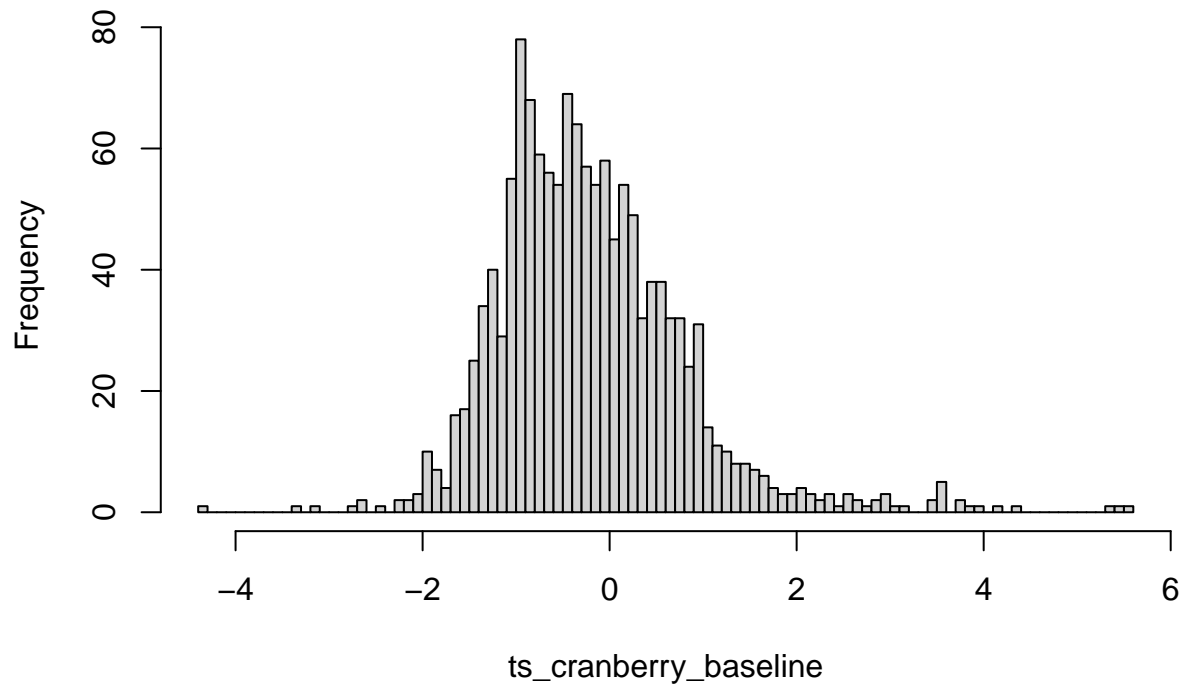
significant_metabolites_df <- data.frame(
  Metabolite = significant_metabolite_names,
  P_Value = significant_pvalues
)
significant_metabolites_df
```

##	Metabolite	P_Value
## 79034	12-Hydroxydodecanoic acid_1	1.433276e-05
## 10413	4-Hydroxybutanoic acid_1	6.267410e-03
## 20975673	Butanoic acid_1	5.706803e-04
## 8117	Diethylene glycol_1	2.382545e-03
## 7768	epsilon-Caprolactam	6.868329e-03
## 5275508	Methyl farnesoate_1	6.020164e-04
## 439230	(R)-Mevalonate_1	1.873338e-03

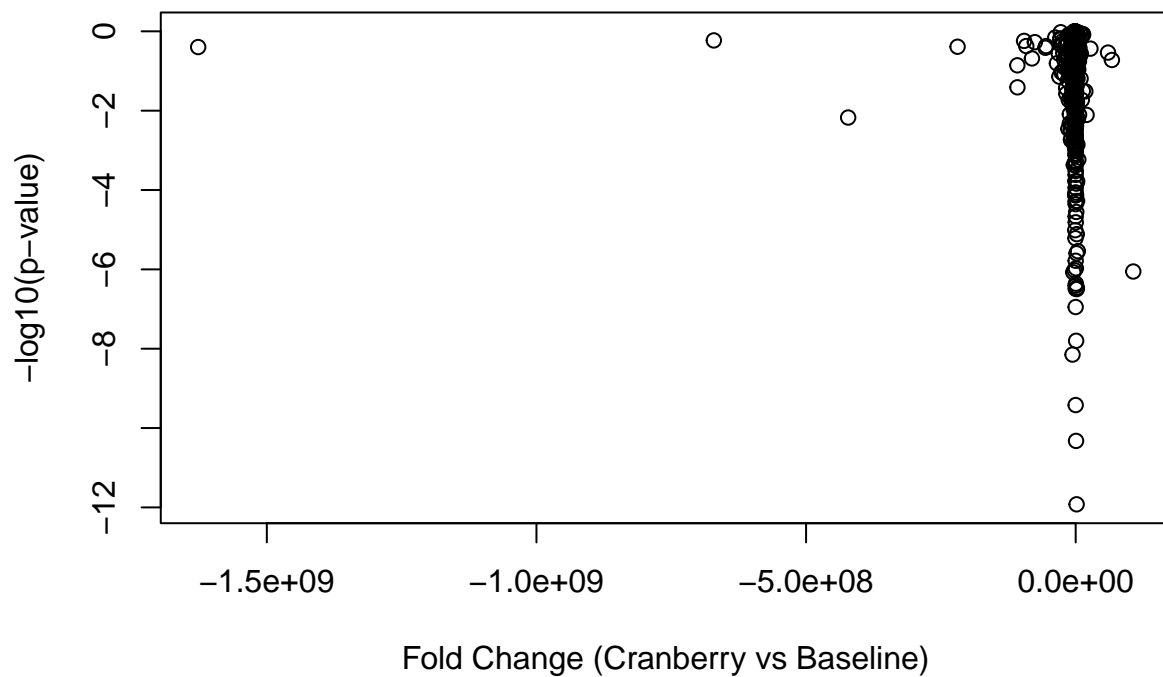
```
#Probamos nuestra función ttest con el grupo baseline y cranberry
```

```
ans_cranberry_baseline <- apply(assay_data, 1, function(x) ttest(x, group_cranberry, group_baseline))
ts_cranberry_baseline <- ans_cranberry_baseline[1, ]
pvals_cranberry_baseline <- ans_cranberry_baseline[2, ]
fc_cranberry_baseline <- ans_cranberry_baseline[3, ]
hist(ts_cranberry_baseline, breaks=100)
```

Histogram of ts_cranberry_baseline



```
plot(fc_apple_baseline, log(pvals_cranberry_baseline),
     xlab = "Fold Change (Cranberry vs Baseline)",
     ylab = "-log10(p-value)")
```



```
#Creamos el dataframe con los metabolitos con p-valores significativos en cranberry vs baseline
significant_indices <- which(pvals_cranberry_baseline < pval_threshold)
```

```
significant_metabolite_names <- rowData(se)$names[significant_indices]
significant_pvalues <- pvals_cranberry_baseline[significant_indices]
```

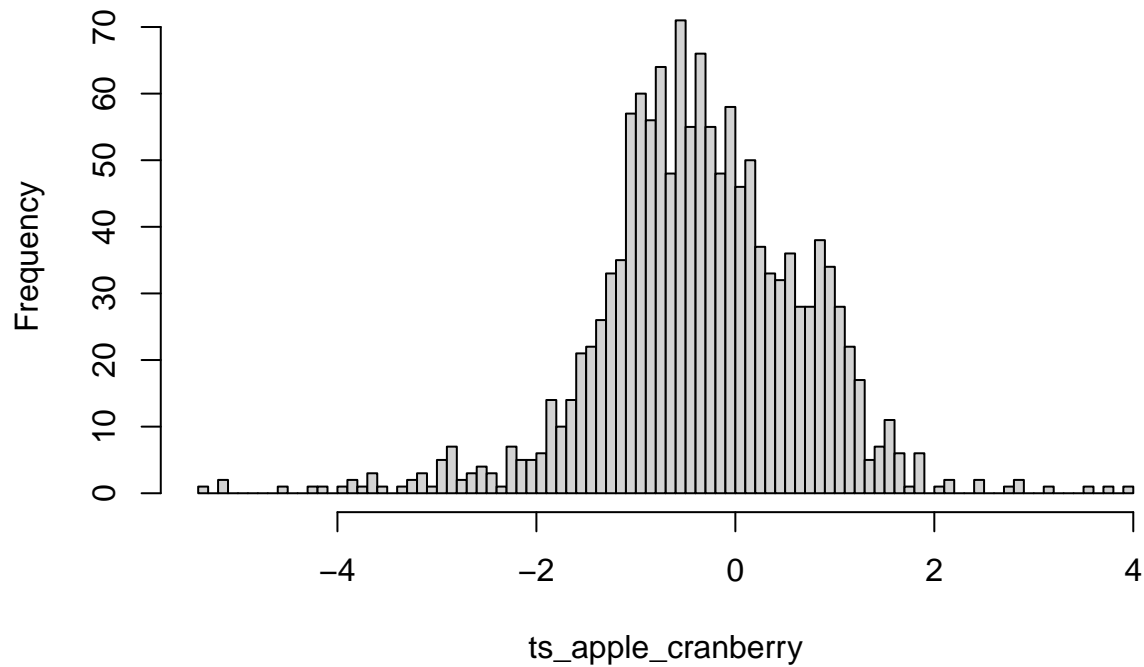
```
significant_metabolites_df <- data.frame(
  Metabolite = significant_metabolite_names,
  P_Value = significant_pvalues
)
significant_metabolites_df
```

##		Metabolite	P_Value
## 13891		2-Chloro-1,4-naphthoquinone	2.431351e-03
## 443071		5-Methyl-3-isoxazolyl sulfate_1	1.509003e-03
## 17531		Azinphos-ethyl_1	2.545646e-03
## 3035199		Decarbamoylgonyautoxin 1_1	6.022137e-03
## 439361		D-Prephenyllactate	1.642070e-03
## 5378303		Furamizole	8.117020e-03
## 21718008		Heterocladol	3.716477e-03
## 71485		Sucralose	8.105095e-05
## 5353		Sulmazole_1	3.078430e-03
## 33676		4-Ketocyclophosphamide	1.726471e-03
## 241		Benzene_1	9.428600e-03
## 5486800		Coenzyme B	2.894539e-04
## 54678503		Dihydroxyfumarate	9.589946e-04
## 464		Hippurate	2.348997e-03
## 92433		Imazosulfuron	3.283761e-05
## 11046097		Indanofan	6.643423e-06
## 798		Indole	1.562000e-03
## 94214		METHYL BETA-D-GALACTOSIDE	4.096395e-04
## 153367		N-(Acetyloxy)benzenamine_1	6.657315e-03
## 441306		Netilmicin	5.429174e-03
## 5281740		Otonecine_1	3.921592e-03
## 996		Phenol	1.518156e-03
## 5462519		Yersiniabactin_1	2.305192e-03

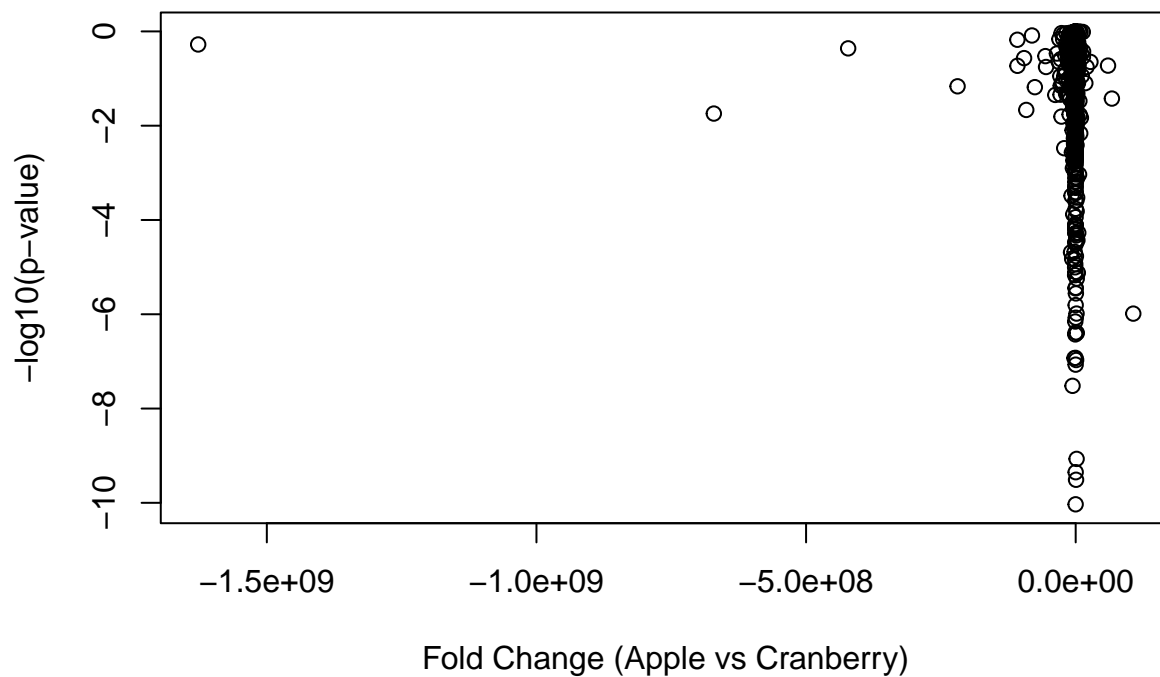
#Probamos nuestra función ttest con el grupo apple y cranberry.

```
ans_apple_cranberry <- apply(assay_data, 1, function(x) ttest(x, group_apple, group_cranberry))
ts_apple_cranberry <- ans_apple_cranberry[1, ]
pvals_apple_cranberry <- ans_apple_cranberry[2, ]
fc_apple_cranberry <- ans_apple_cranberry[3, ]
hist(ts_apple_cranberry, breaks=100)
```

Histogram of ts_apple_cranberry



```
plot(fc_apple_baseline, log(pvals_apple_cranberry),
     xlab = "Fold Change (Apple vs Cranberry)",
     ylab = "-log10(p-value)")
```



```
#Creamos el dataframe con los metabolitos con p-valores significativos en cranberry vs apple
significant_indices <- which(pvals_apple_cranberry < pval_threshold)
```

```

significant_metabolite_names <- rowData(se)$names[significant_indices]
significant_pvalues <- pvals_apple_cranberry[significant_indices]

significant_metabolites_df <- data.frame(
  Metabolite = significant_metabolite_names,
  P_Value = significant_pvalues
)
significant_metabolites_df

```

##	Metabolite	P_Value
## 13891	2-Chloro-1,4-naphthoquinone	9.768249e-04
## 443071	5-Methyl-3-isoxazolyl sulfate_1	5.284047e-03
## 17531	Azinphos-ethyl_1	3.858173e-03
## 439361	D-Prephenyllactate	1.686511e-03
## 4488	Niflumic acid_1	5.679420e-03
## 71485	Sucralose	8.693355e-05
## 5353	Sulmazole_1	3.011004e-03
## 442988	Theogallin	9.223453e-03
## 1131	Thiamin monophosphate	7.918614e-03
## 79034	12-Hydroxydodecanoic acid_1	4.400110e-05
## 33676	4-Ketocyclophosphamide	8.507170e-03
## 11915	alpha-Oxo-benzeneacetic acid_1	8.030251e-03
## 20975673	Butanoic acid_1	6.079522e-03
## 5486800	Coenzyme B	5.430069e-04
## 8117	Diethylene glycol_1	7.172531e-03
## 54678503	Dihydroxyfumarate	8.510128e-04
## 464	Hippurate	2.512805e-03
## 780	Homogentisate_1	1.616567e-03
## 92433	Imazosulfuron	7.400934e-05
## 11046097	Indanofan	1.153005e-04
## 798	Indole	1.665301e-03
## 91619	L-2-Amino-4-(hydroxymethylphosphinyl)butanoate	6.708992e-03
## 94214	METHYL BETA-D-GALACTOSIDE	9.391452e-04
## 5275508	Methyl farnesoate_1	4.290305e-03
## 153367	N-(Acetyloxy)benzenamine_1	2.124698e-03
## 441306	Netilmicin	9.823143e-04
## 5281740	Otonecine_1	5.974238e-03
## 996	Phenol	2.302839e-03
## 439230	(R)-Mevalonate_1	2.516357e-03
## 11236	Semicarbazide hydrochloride	4.347890e-03
## 107849	Versicolorin B_1	9.331367e-03

Con los histogramas de los estadísticos t y los volcano plots obtenidos a partir de los t-tests, podemos concluir que apenas hay metabolitos con diferencias significativas entre grupos, sin embargo, hemos localizado aquellos con un p-valor significativo.

Ahora vamos a realizar una agrupación jerárquica de las muestras y metabolitos. Ya que hay más de 1500 metabolitos, voy a seleccionar aquellos que se expresan de forma significativamente diferencial entre dos grupos. Vamos a estudiar la diferencia particularmente del grupo de manzana vs el de arándano rojo, ya que ambos contienen procianidinas, pero los arándanos rojos contienen una cantidad más elevada, por lo que sería interesante analizar como esta diferencia influye en la expresión de metabolitos. Sin embargo, sería interesante realizar este análisis también en apple vs baseline y cranberry vs baseline.

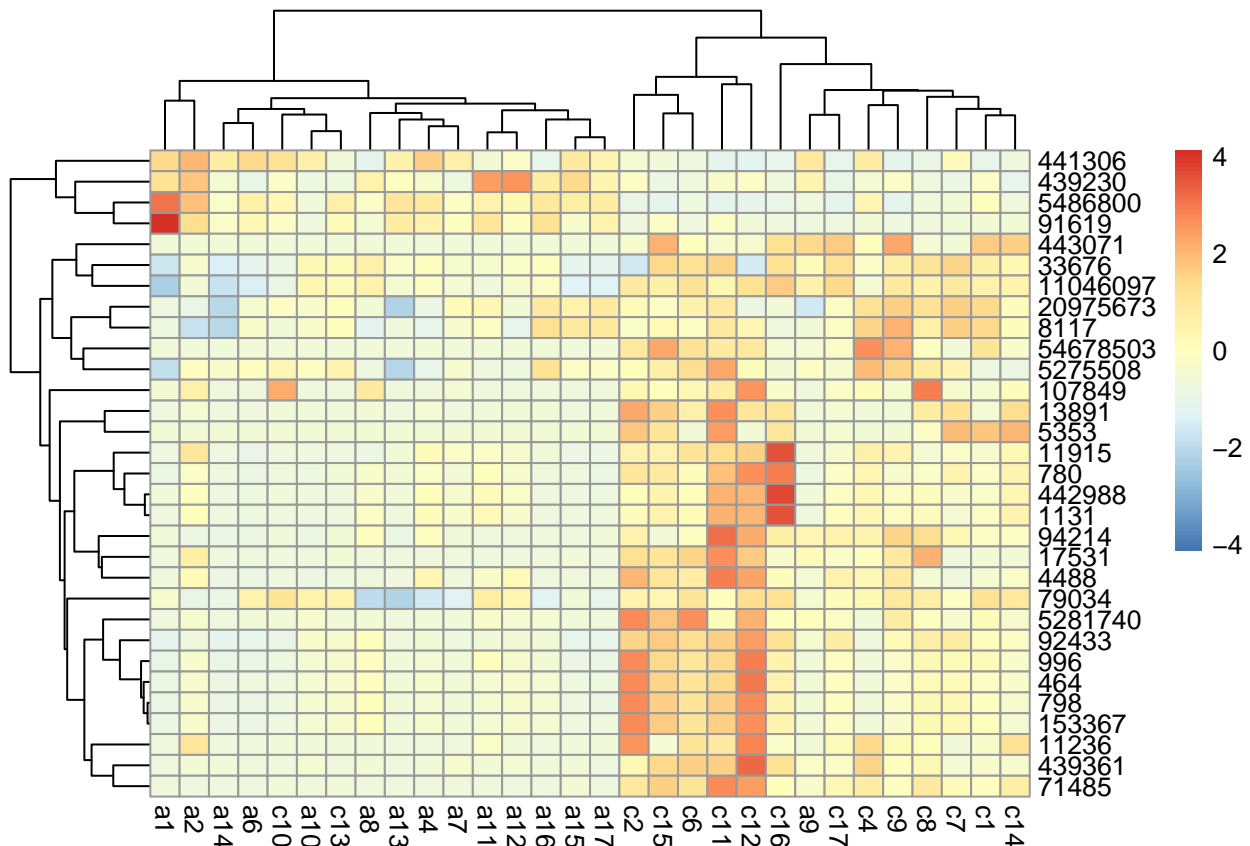

```

# Seleccionamos los datos con expresión diferencial significativa del paso anterior (apples vs cranberry)
assay_data_significant <- assay_data[significant_indices, ]

# Seleccionamos las columnas que comienzan con "a" (apple) o "c" (cranberry)
app_cran_samples <- grep("^a|c)", colnames(assay_data_significant), value = TRUE)
assay_data_cranberry_apple <- assay_data_significant[, app_cran_samples ]

library(pheatmap)
# Generamos el heatmap con la agrupación jerárquica
pheatmap(
  assay_data_cranberry_apple,
  scale = "row",
  clustering_distance_rows = "euclidean",
  clustering_distance_cols = "euclidean",
  clustering_method = "complete",
  show_rownames = TRUE,
  show_colnames = TRUE
)

```



Los tonos rojos representan niveles altos de expresión, mientras que los tonos azules indican niveles bajos, y los tonos amarillos muestran niveles intermedios. Observamos una mayor intensidad de expresión en las muestras del grupo de arándano rojo en comparación con las del grupo de manzana, y esta diferencia es especialmente marcada en 5 de las muestras de arándano. En el grupo de manzana, la expresión es más homogénea y moderada, mientras que en el grupo de arándano rojo se aprecia una mayor variabilidad, con niveles de expresión generalmente más altos. Además, las muestras con alta expresión en el grupo de arándano rojo han sido agrupadas, lo que indica que las diferencias son lo suficientemente pronunciadas para ser capturadas por el análisis de agrupamiento.

Por último vamos a transformar el archivo con los datos (features.csv) a un archivo de texto, y los archivos con los metadatos (metaboliteNames.csv y metadata.csv) en archivos Markdown.

```
library(knitr)
# Primer guardamos features como un archivo de texto
write.table(features, "features.txt")

# Creamos una tabla con metabolite_names en formato Markdown y luego lo guardamos en un archivo .md

met_names <- kable(metabolite_names, format = "markdown")
writeLines(met_names, "metabolite_metadata.md")

# Hacemos lo mismo con metadata
sample_metadata <- kable(metadata, format = "markdown")
writeLines(sample_metadata, "sample_metadata.md")
```

Link del repositorio de github:

<https://github.com/carmenanavarro/Navarro-Andres-Carmen-PEC1>