

Informe - PEC1- Análisis de datos ómicos

Magdalena Albelda Berenguer

Tabla de contenidos

1	Resumen	1
2	Objetivos	2
3	Métodos	2
4	Resultados.....	4
4.1	Exploración inicial de los datos	4
4.2	PCA	5
4.3	Clústeres jerárquicos	6
4.4	Correlación	6
5	Discusión.....	7
6	Conclusiones.....	9
7	Referencias.....	10
8	Anexos.....	12

1 Resumen

Este estudio analiza los datos metabolómicos obtenidos por Kang et al. (2018) [1]. Estos datos registran las concentraciones de metabolitos microbianos fecales detectadas en niños neurotípicos y niños con trastorno del espectro autista (ASD). Los datos fueron estructurados como un objeto *SummarizedExperiment* antes de su análisis. Posteriormente, se aplicaron diversas pruebas estadísticas, análisis de componentes principales (PCA), clustering y análisis de correlaciones para identificar posibles patrones en los perfiles metabolómicos de ambos grupos de estudio. El análisis exploratorio no reveló diferencias marcadas entre los perfiles metabólicos microbianos de niños neurotípicos y niños con ASD. Si bien algunos metabolitos mostraron diferencias entre los grupos de niños, no se identificaron biomarcadores claros que se puedan relacionar con el ASD.

2 Objetivos

El principal objetivo del estudio fue analizar las diferencias en metabolitos microbianos entre muestras fecales de niños con trastorno del espectro autista (ASD, por sus siglas en inglés) y niños neurotípicos mediante diferentes técnicas estadísticas en el lenguaje de programación R. Los objetivos específicos fueron:

- Obtener los datos y guardarlos en un objeto de clase *SummarizedExperiment*.
- Explorar la distribución de los metabolitos en ambos grupos para identificar posibles patrones diferenciadores.
- Evaluar si existen diferencias significativas en las concentraciones de metabolitos entre los grupos de estudio.
- Identificar qué metabolitos están más representados en cada grupo y su posible impacto en la diferenciación entre grupos.
- Detectar posibles agrupamientos naturales en los datos que puedan reflejar diferencias metabólicas entre la microbiota de los grupos.
- Analizar correlaciones entre metabolitos para comprender posibles interacciones metabólicas relevantes en el contexto del ASD.

3 Métodos

Los datos utilizados en este análisis provienen del estudio de Kang et al. (2018) [1] y fueron obtenidos del repositorio de GitHub: [The Curated Gut Microbiome Metabolome Data Resource](#) [2]. Se trata de datos metabólicos microbianos obtenidos a partir de heces de niños con trastorno del espectro autista y neurotípicos. La cuantificación de metabolitos se realizó mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón (^1H -NMR), y los datos se expresan en micromoles por gramo de heces secas ($\mu\text{mol/g-dry stool}$).

Para la manipulación y análisis de los datos, utilizamos el lenguaje de programación R. En primer lugar, subimos los registros de los metabolitos y los metadatos a R para su procesamiento. Para facilitar la gestión de los datos, creamos un objeto de clase *SummarizedExperiment*.

El análisis exploratorio inicial consistió en un resumen estadístico de los metabolitos (*summary()*) y una visualización gráfica mediante un diagrama de cajas (*geom_boxplot()*), con el fin de evaluar la distribución de los datos y detectar posibles valores atípicos. Para estudiar si existían diferencias significativas en las concentraciones de los metabolitos entre los dos grupos del estudio (*Autistic* vs. *Neurotypical*), utilizamos la prueba no paramétrica de Wilcoxon (*wilcox.test()*). Esta prueba es adecuada debido a que los datos metabólicos no siguen una distribución normal (comprobado con el test de Shapiro-Wilk, *shapiro.test()*). Asimismo, aplicamos el ajuste de Benjamini-Hochberg (*p.adjust(method = "BH")*)

para corregir los valores p y reducir el riesgo de cometer errores tipo I (falsos positivos).

Posteriormente, realizamos varios análisis multivariantes. Para reducir la dimensionalidad de los datos y visualizar la separación entre los grupos del estudio, ejecutamos el análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés). La PCA es una técnica que transforma las variables originales en componentes ortogonales, de manera que los primeros componentes explican la mayor variabilidad posible en los datos. Para este análisis, los datos fueron previamente filtrados, para eliminar metabolitos que no se detectaron en suficientes muestras (≤ 3); y centrados (*scale(center = T)*), ya que las variables están representadas en la misma unidad, aunque tengan escalas numéricas diferentes. Por lo tanto, realizamos la PCA sobre la matriz de covarianzas de los datos centrados con la función *prcomp()*, y examinamos la contribución de cada metabolito a los componentes principales (PC) extrayendo los *loadings* (cargas), lo que permite identificar que metabolitos tienen un mayor impacto en la variabilidad de los componentes.

Para explorar patrones de agrupamiento entre metabolitos y sujetos, realizamos análisis de clustering jerárquico en dos niveles: primero agrupamos los metabolitos y luego los individuos. Primero, escalamos la matriz de metabolitos (filtrada previamente) para asegurar que todas las variables tengan una contribución equitativa al análisis (*scale(center = T, scale = T)*). Luego, generamos un mapa de calor (heatmap) para visualizar cómo se agrupan los metabolitos según su concentración en relación con los grupos de estudio (*pheatmap()*). En este paso, utilizamos el método de Ward para minimizar la varianza dentro de los clústeres, facilitando la identificación de patrones en los datos. Para el segundo análisis de clustering jerárquico, sobre los sujetos, calculamos la distancia (*dist()*) entre las muestras utilizando la matriz de metabolitos escalada y aplicamos nuevamente el método de Ward para generar un dendrograma (*hclsut()*) que permite identificar agrupamientos naturales entre las muestras.

Finalmente, analizamos la correlación entre los metabolitos para identificar asociaciones significativas con la función *cor()*, y mediante un heatmap (*pheatmap()*) visualizamos qué metabolitos presentan relaciones positivas o negativas entre sí, facilitando la comprensión de posibles interacciones metabólicas.

Las librerías utilizadas en R fueron *SummarizedExperiment*, *ggplot2*, *dplyr*, *pheatmap*, *tibble*, *reshape2*, *gridExtra*, entre otras, así como funciones nativas de R.

4 Resultados

4.1 Exploración inicial de los datos

El resumen estadístico inicial de los datos metabólicos nos permite observar que existen metabolitos no detectados en ninguna muestra, como el homovanilato y la urea (Tabla S1). Además, podemos ver que algunos metabolitos presentan concentraciones significativamente más altas en comparación con los demás, como el acetato, que tiene una media de 172.42 $\mu\text{mol/g}$ de heces secas (Tabla S1).

La visualización inicial de los metabolitos según el grupo de estudio (Figura 1) también pone en evidencia que el acetato es el metabolito con las concentraciones más altas en las heces de ambos grupos de niños.

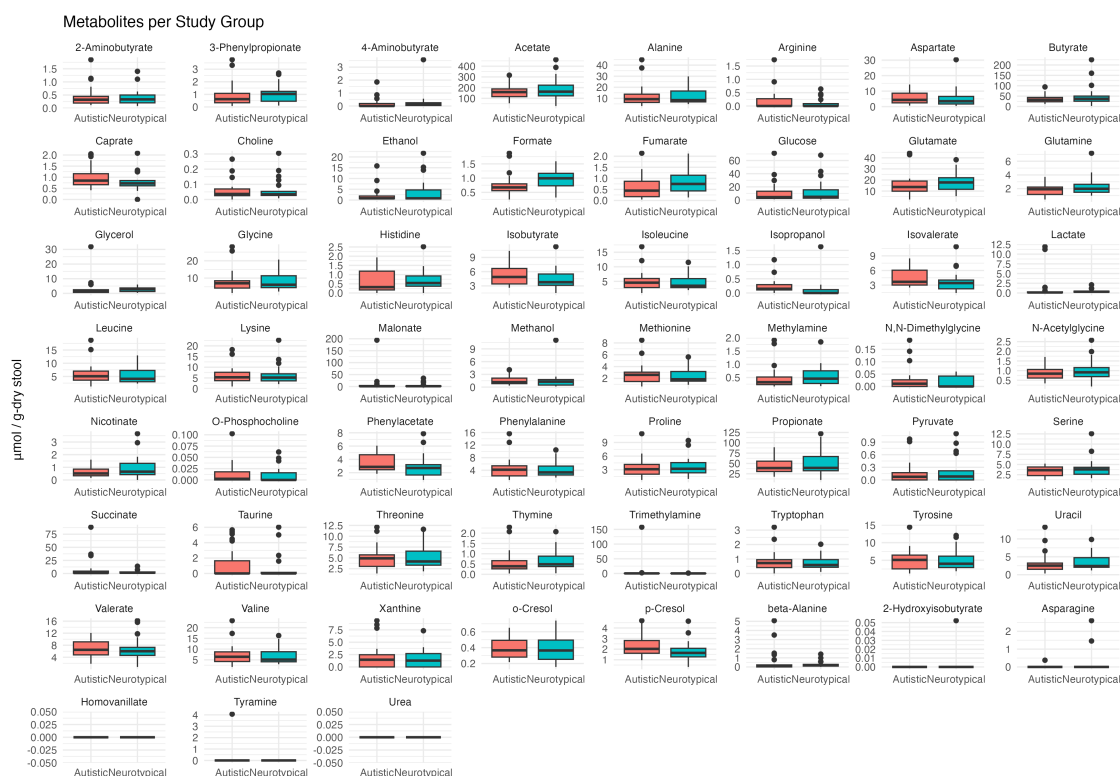


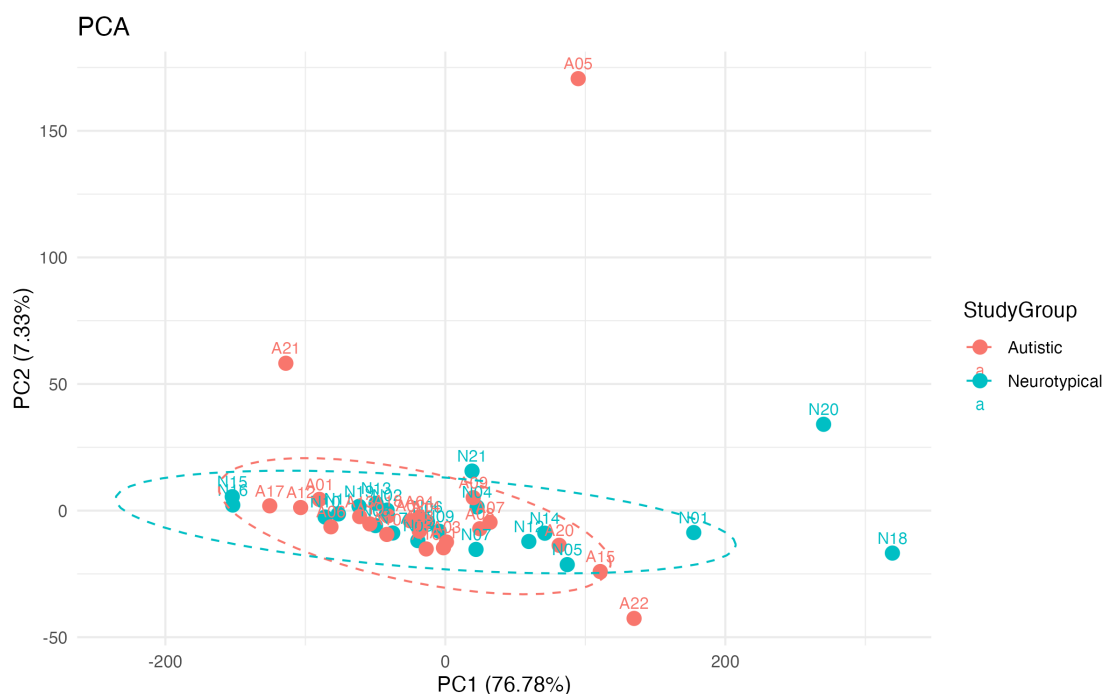
Figura 1. Distribución de la concentración de cada metabolito según grupo de estudio (Autistic o Neurotypical).

A simple vista, no se aprecian diferencias claras entre los dos grupos de estudio. Algunos metabolitos como el glutamato, el fumarato o el formato parecen estar en mayor concentración en niños neurotípicos (Figura 1). Otros como el isopropanol, el *p*-cresol o el isobutirato parecen estar en mayor concentración en niños con ASD (Figura 1). Por ello, realizamos la prueba no paramétrica de Wilcoxon para detectar diferencias significativas. Tras la prueba, obtenemos que un valor *p* de 0.001 (< 0.05)

para el isopropanol (Tabla S2), por lo que, para este metabolito, podemos decir que existe una diferencia significativa entre los niños neurotípicos y los niños con ASD. Sin embargo, al aplicar la corrección de Benjamini-Hochberg, el valor p obtenido es 0.057 (> 0.05) (Tabla S2). Al ser mayor que el umbral establecido de 0.05, no se considera una diferencia significativa. Algo similar ocurre con el lactato, cuyo valor p inicial es 0.026 (< 0.05) (Tabla S2), pero después de la corrección, se obtiene 0.746 (> 0.05) (Tabla S2). El tamaño de la muestra (21 niños en el grupo neurotípico y 23 en el grupo ASD) es pequeño, lo que podría influir en estos resultados. Se necesitaría una mayor muestra para verificar estos resultados, pero al menos sugiere metabolitos que podrían ser relevantes en futuros estudios.

4.2 PCA

La representación gráfica de la PCA nos muestra que los grupos de estudio se encuentran solapados y no se distingue una separación clara entre ellos (Figura 2). También se detectaron varias muestras atípicas (*outliers*), como A05 y A21 en el grupo de ASD, y N18 y N20 en el grupo neurotípico (Figura 2).



registradas. En el caso de la PC2, el metabolito que más contribuye es el malonato (0.8951) (Table S3). El butirato es el segundo metabolito que más contribuye en ambos PCs (0.3423 en PC1 y 0.3067 en PC2) (Tabla S3). En el resumen estadístico y la primera visualización gráfica observamos que este también es un metabolito detectado en mayores cantidades que el resto (Tabla S1, Figura 1).

4.3 Clústeres jerárquicos

Los clústeres jerárquicos muestran que no hay una agrupación clara de metabolitos según el grupo de estudio (Figura 3). De hecho, las muestras tampoco se agrupan en los dos grupos del estudio, tenemos a los sujetos del estudio agrupados aleatoriamente sin separación entre niños neurotípicos o con ASD (Figura S1).

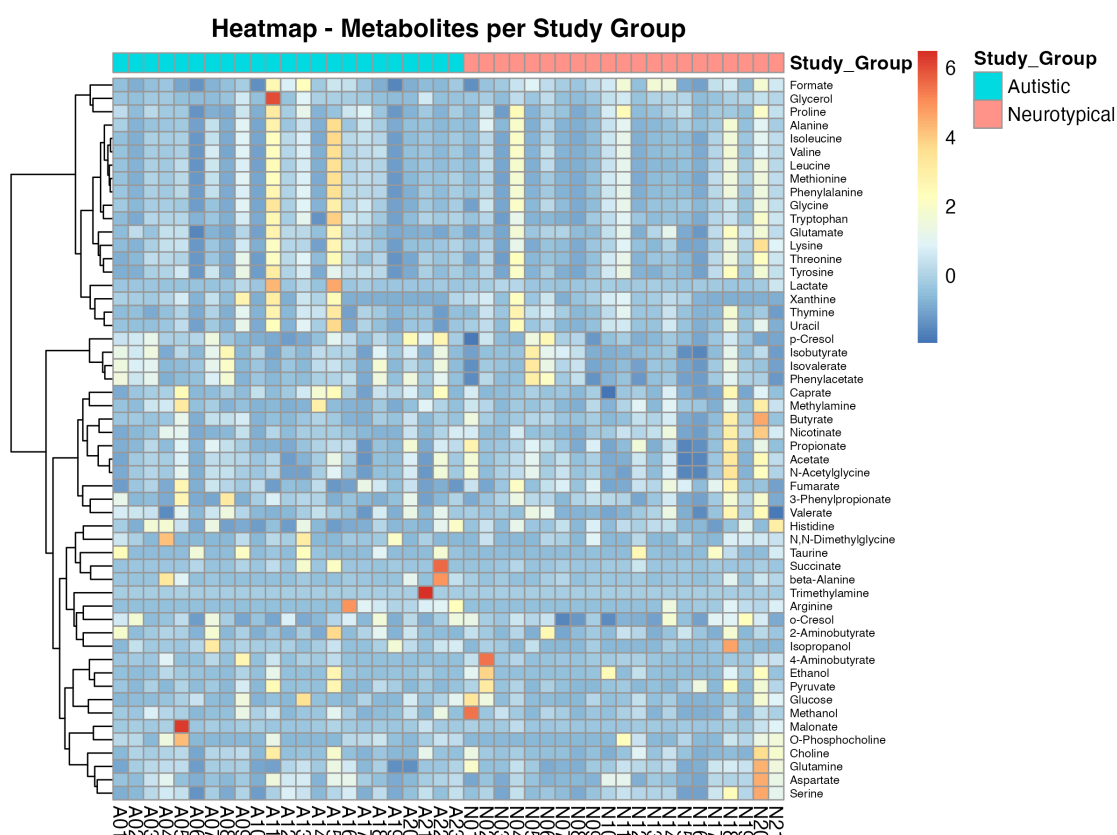


Figura 3. Heatmap de las concentraciones de metabolitos (escaladas), agrupados mediante el método de Ward. Las filas representan metabolitos y las columnas a los individuos.

4.4 Correlación

Finalmente, la correlación entre metabolitos revela una clara relación entre ciertos grupos de metabolitos (Figura 4). Los metabolitos: lisina, glutamato, treonina,

tirosina, glicina, triptófano, isoleucina, valina, metionina, leucina, fenilalanina y alanina están altamente correlacionados. Además, *p*-cresol, isobutirato, isovalerato y fenilacetato, así como butirato, caprato, propionato, acetato y N-acetilglucina, forman otros dos grupos con alta correlación (Figura 4).

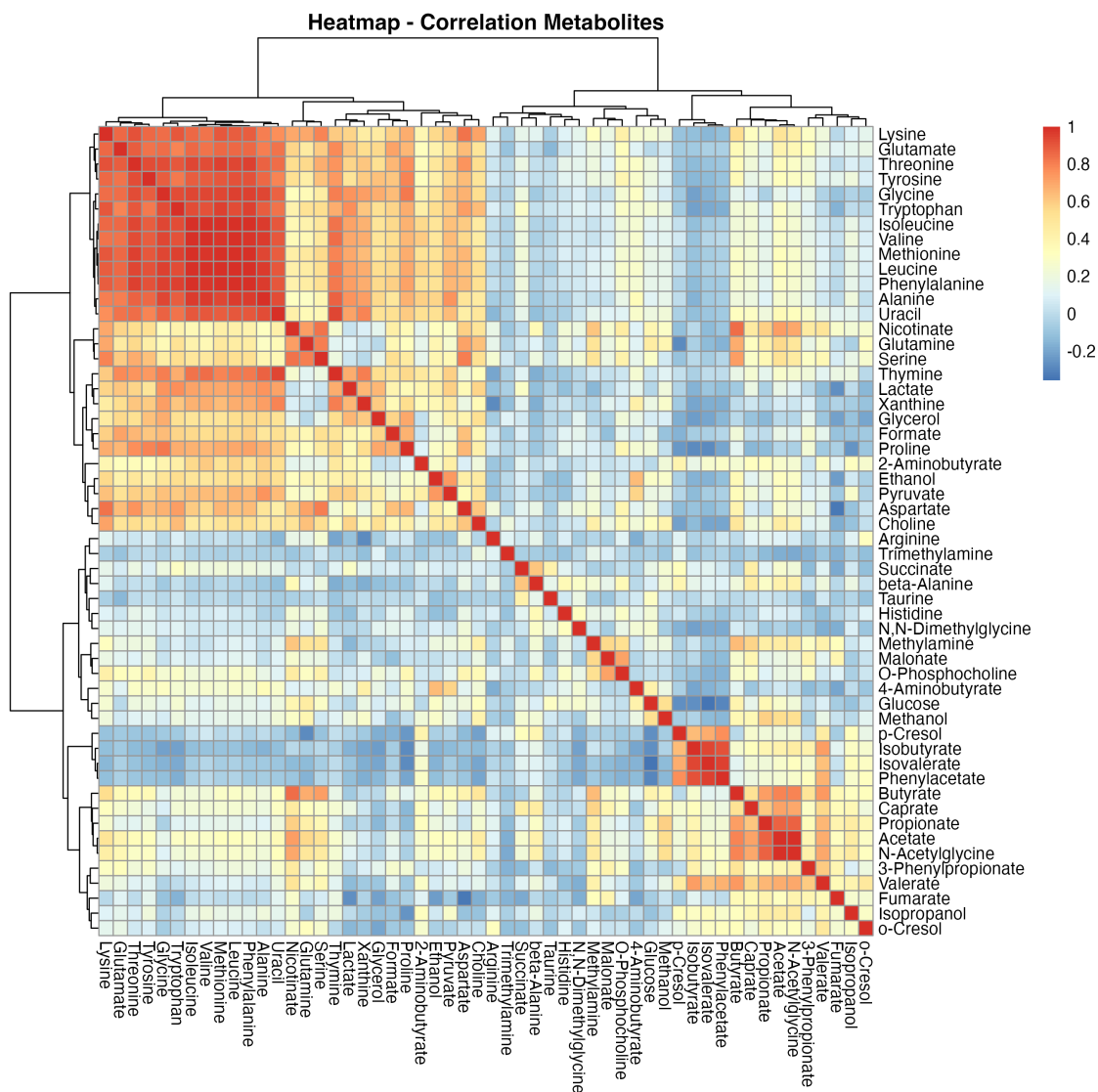


Figura 4. Heatmap de correlación entre metabolitos, donde los colores representan el coeficiente de correlación.

5 Discusión

En este estudio nos hemos centrado en el análisis de metabolitos microbianos presentes en las heces de niños neurotípicos y con trastorno del espectro autista (ASD), con el objetivo de explorar posibles alteraciones metabólicas asociadas con el

ASD. Este conjunto de datos me ha parecido relevante por la inclusión de metabolitos microbianos. Cada vez más estudios se centran en como la microbiota intestinal puede influir en la salud humana, incluyendo la fisiología cerebral y las características conductuales [3, 4]. Los metabolitos como los ácidos grasos de cadena corta (SCFAs, por sus siglas en inglés), son productos de la fermentación bacteriana, y tienen el potencial de influir en el cerebro a través del eje intestino-cerebro, lo que podría ayudar a explicar algunas de las alteraciones observadas en los niños con ASD [1].

Hemos trabajado con los datos en un objeto de clase *SummarizedExperiment*, que es una estructura de datos diseñada para almacenar información experimental de manera eficiente. Este objeto permite almacenar los metabolitos en una matriz de expresión, junto con los metadatos correspondientes de las muestras y la información asociada a cada metabolito. La clase *ExpressionSet* se usa principalmente para datos de microarrays y es menos flexible. Por ello, la clase *SummarizedExperiment* es más apropiada aquí.

Las pruebas de Wilcoxon, aplicadas para detectar diferencias significativas entre los grupos, indicaron diferencias en el metabolito isopropanol, pero estas se desvanecieron después de la corrección de Benjamini-Hochberg (Tabla S2), lo que apunta a la necesidad de interpretar los resultados con cautela. La corrección de Benjamini-Hochberg ajusta el valor p para tener en cuenta el número de comparaciones realizadas y, por lo tanto, reduce la posibilidad de detectar falsos positivos. Al aplicar esta corrección, los valores p de varios metabolitos dejaron de ser significativos. Este patrón sugiere que la potencia estadística de nuestro análisis se vio limitada por el tamaño de la muestra, lo cual es una restricción importante. Es interesante que en el estudio original de donde provienen los datos, las concentraciones de isopropanol fueron significativamente más altas en las heces de niños con ASD aun después de múltiples pruebas de corrección [1]. Aun así, los investigadores mencionan que este metabolito no tiene una relación conocida con el ASD, y no se conoce porque se produciría en mayores niveles en niños con este trastorno [1].

Los estudios de metabolómica a menudo requieren tamaños de muestra grandes para alcanzar suficiente poder estadístico, y es probable que con una muestra más amplia que la estudiada aquí se pudieran identificar diferencias más precisas entre los grupos. La representación de los grupos mediante PCA mostró una notable superposición entre los grupos neurotípicos y con ASD, sin una separación clara (Figura 2). Este resultado puede reflejar una heterogeneidad dentro de los propios grupos, lo que dificulta la identificación de patrones metabólicos específicos del ASD.

El análisis de clúster jerárquico no identificó tampoco agrupaciones claras de metabolitos asociadas a los grupos de estudio (Figura 3). Sin embargo, se identificaron grupos de metabolitos altamente correlacionados (Figura 4). Este

patrón de correlación entre metabolitos puede explicarse por su implicación en vías metabólicas comunes. Por ejemplo, metabolitos como la lisina, glutamato, glicina, triptófano y otros aminoácidos son precursores de neurotransmisores y están involucrados en la síntesis de proteínas y en la regulación del sistema nervioso central [5]. La interrelación entre estos metabolitos podría reflejar la influencia de vías metabólicas relacionadas con la función cerebral, las cuales pueden estar alteradas en el ASD. En particular, el glutamato es un neurotransmisor excitador clave en el cerebro, y su metabolismo está estrechamente relacionado con la función cerebral y la actividad neuronal. Alteraciones en el metabolismo del glutamato pueden estar relacionadas con el ASD [1]. En el estudio original de Kang et al. (2018), señalan que el grupo de niños con ASD tiene menores concentraciones de glutamato, pero igual que en este estudio, no ven diferencias significativas [1].

Por otro lado, el hecho de que otros grupos de metabolitos, como los SCFAs (acetato, butirato, propionato) también estén correlacionados entre sí, refuerza la idea de que estos comparten una vía metabólica en común. Estos metabolitos son productos de la fermentación bacteriana en el intestino y están relacionados con la regulación de la función intestinal y la respuesta inmune [6]. También, es interesante la relación entre *p*-cresol, isobutirato, isovalerato y fenilacetato, ya que son metabolitos relacionados con la actividad de la microbiota intestinal y pueden indicar disbiosis intestinal. En particular, *p*-cresol se ha relacionado con el ASD [7], y en el estudio original de los datos, señalan que el grupo de niños con ASD tiene mayores concentraciones de *p*-cresol, pero igual que ocurre con el glutamato son diferencias no significativas [1]. En este análisis, tampoco hemos detectado diferencias significativas en este metabolito (Tabla S2), aunque sí que se observen mayores concentraciones en el grupo con ASD (Figura 1).

6 Conclusiones

La investigación sobre cómo la microbiota intestinal y sus metabolitos afectan el cerebro es extremadamente prometedora. Al centrarnos en los metabolitos microbianos, este estudio apunta a una de las posibles vías que podrían ayudar a explicar algunas de las características biológicas del ASD. Si bien no logramos identificar diferencias metabólicas claras entre los grupos en este estudio, los resultados subrayan la importancia de profundizar en el estudio de la microbiota intestinal y sus metabolitos en trastornos como el ASD. En estudios más profundos es probable que se puedan identificar biomarcadores específicos asociados al ASD, lo que podría abrir nuevas posibilidades para la prevención y tratamiento de este trastorno.

Aunque este estudio ha proporcionado información interesante sobre los perfiles metabólicos de niños con ASD y neurotípicos, el tamaño de la muestra limita las conclusiones definitivas. Se necesitarían cohortes más grandes para confirmar la existencia de diferencias significativas y para explorar con mayor profundidad los

vínculos entre el perfil metabólico y el ASD. Además, nos hemos limitado solo al estudio de los perfiles metabólicos, mientras que el estudio original contiene también datos de los géneros bacterianos, lo que también puede dar indicaciones de que microorganismos están más o menos representados en los niños con trastorno del espectro autista. Esta información adicional es importante ya que al conocer que bacterias están presentes podríamos hipotetizar sobre que rutas metabólicas están activas, y ver si hay relación entre los géneros bacterianos y los metabolitos detectados.

En conclusión, este estudio no ha encontrado diferencias claras entre los perfiles metabólicos microbianos de muestras de niños neurotípicos y con ASD. Si bien algunos metabolitos mostraron correlaciones significativas entre ellos no se detectó una diferenciación clara entre los dos grupos. A pesar de que los resultados obtenidos no permitieron diferenciar claramente a los niños neurotípicos de los niños con ASD, este enfoque sigue siendo prometedor y podría proporcionar pistas valiosas para futuros estudios.

7 Referencias

Repositorio de GitHub:

1. Albelda-Berenguer-Magdalena-PEC1-AnalisisDatosOmicos:
<https://github.com/magalbe91/Albelda-Berenguer-Magdalena-PEC1-AnalisisDatosOmicos>

Referencias:

1. Kang DW, Ilhan ZE, Isern NG, Hoyt DW, Howsmon DP, Shaffer M, Lozupone CA, Hahn J, Adams JB, Krajmalnik-Brown R. Differences in fecal microbial metabolites and microbiota of children with autism spectrum disorders. *Anaerobe*. 2018 Feb;49:121-131. doi: 10.1016/j.anaerobe.2017.12.007.
2. The Curated Gut Microbiome Metabolome Data Resource (<https://github.com/borenstein-lab/microbiome-metabolome-curated-data>). Muller E, Algavi YM, Borenstein E. The gut microbiome-metabolome dataset collection: a curated resource for integrative meta-analysis. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2022 Oct 15;8(1):79. doi: 10.1038/s41522-022-00345-5.
3. Loh JS, Mak WQ, Tan LKS et al. Microbiota–gut–brain axis and its therapeutic applications in neurodegenerative diseases. *Sig Transduct Target Ther* 9, 37 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01743-1>
4. Morton JT, Jin DM, Mills RH et al. Multi-level analysis of the gut–brain axis shows autism spectrum disorder-associated molecular and microbial profiles. *Nat Neurosci* 26, 1208–1217 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41593-023-01361-0>

5. Dalangin R, Kim A, Campbell RE. The Role of Amino Acids in Neurotransmission and Fluorescent Tools for Their Detection. *Int J Mol Sci*. 2020 Aug 27;21(17):6197. doi: 10.3390/ijms21176197. PMID: 32867295; PMCID: PMC7503967.
6. Mann ER, Lam YK & Uhlig HH. Short-chain fatty acids: linking diet, the microbiome and immunity. *Nat Rev Immunol* 24, 577–595 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41577-024-01014-8>
7. Bermudez-Martin P, Becker, JAJ, Caramello N et al. The microbial metabolite p-Cresol induces autistic-like behaviors in mice by remodeling the gut microbiota. *Microbiome* 9, 157 (2021). <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01103-z>

8 Anexos

Tabla S1. Resultado del análisis estadístico inicial sobre los datos contenidos en el *SummarizedExperiment*. Se incluyen todos los metabolitos analizados, el *chemical shape indicator* (DSS-D6) y el pH. En la tabla se muestran el valor mínimo detectado (Min.), el valor del primer cuartil (1st Qu.), la mediana (Median), la media (Mean), el valor del tercer cuartil (3rd Qu.), y el valor máximo detectado (Max.).

Metabolite	Min.	1st Qu.	Median	Mean	3rd Qu.	Max.
2-Aminobutyrate	0,0806	0,1972	0,3276	0,4366	0,4856	1,8492
3-Phenylpropionate	0,0757	0,3374	0,8452	1,0236	1,2372	3,7582
4-Aminobutyrate	0,0000	0,0000	0,0844	0,2665	0,2503	3,5772
Acetate	28,3100	120,3800	159,4600	172,4200	200,2800	461,3900
Alanine	3,0820	6,4060	9,1100	12,3140	16,1080	44,9430
Arginine	0,0000	0,0000	0,0000	0,1551	0,1860	1,7388
Aspartate	0,3926	1,9147	3,7413	5,6603	7,4649	30,2955
Butyrate	2,4190	25,2740	34,0310	44,8950	48,7130	225,6550
Caprate	0,0000	0,6257	0,7704	0,9039	1,1005	2,0839
Choline	0,0000	0,0253	0,0353	0,0625	0,0688	0,3054
Ethanol	0,2674	0,5983	0,8104	3,0128	2,1915	21,7593
Formate	0,2498	0,6019	0,7623	0,8667	1,0865	1,8756
Fumarate	0,0448	0,2423	0,5367	0,6960	0,9718	2,1386
Glucose	0,7875	2,5549	4,6013	12,5739	14,3867	71,2266
Glutamate	2,4130	10,0400	15,8140	17,3090	20,3110	44,2080
Glutamine	0,4188	1,3217	1,9222	2,0530	2,4608	7,1776
Glycerol	0,2750	0,8179	1,7093	2,9474	3,3346	31,8884
Glycine	1,4090	4,3840	6,9320	8,3290	10,8300	28,1550
Histidine	0,0000	0,2862	0,4759	0,6976	0,9900	2,5187
Isobutyrate	1,5050	3,3650	4,0610	4,8210	6,2870	11,2680
Isoleucine	1,0200	2,8560	4,2590	5,0320	6,0050	16,9130
Isopropanol	0,0000	0,0000	0,1152	0,1866	0,1879	1,6323
Isovalerate	1,3930	2,9650	3,5610	4,2210	5,1280	10,8860
Lactate	0,0000	0,1051	0,2002	0,8729	0,4581	11,9284
Leucine	1,2200	3,2490	4,9220	5,9280	7,1120	18,7350
Lysine	0,9958	3,5631	5,2729	6,5065	7,4212	22,6861
Malonate	0,1931	0,5646	1,2337	8,2897	3,5379	194,1936
Methanol	0,1437	0,6237	1,2178	1,6086	1,8717	11,0581
Methionine	0,6348	1,4995	2,3103	2,6378	3,1664	8,4703
Methylamine	0,1617	0,2576	0,3838	0,5392	0,6530	1,9154
N,N-Dimethylglycine	0,0000	0,0000	0,0056	0,0242	0,0331	0,1874
N-Acetylglycine	0,1778	0,6651	0,8676	0,9359	1,1170	2,5789

Nicotinate	0,0000	0,3634	0,5978	0,8161	1,1082	3,6652
O-Phosphocholine	0,0000	0,0000	0,0000	0,0128	0,0179	0,1026
Phenylacetate	0,9037	2,3310	2,8312	3,2419	3,9177	7,8744
Phenylalanine	0,9077	2,3153	3,9564	4,6655	5,4004	15,6481
Proline	0,7485	2,1396	3,1628	3,6728	4,5497	10,9499
Propionate	9,9930	30,5370	39,0160	47,3350	56,1140	122,2140
Pyruvate	0,0000	0,0000	0,0800	0,1947	0,2056	1,0999
Serine	1,2060	2,4010	3,6780	3,6550	4,3610	12,5600
Succinate	0,0833	0,7513	1,2370	5,7182	3,0013	88,5740
Taurine	0,0000	0,0000	0,0000	1,0006	0,3043	6,0242
Threonine	1,4010	3,2260	4,2670	5,0800	5,7270	12,1110
Thymine	0,0409	0,3189	0,4568	0,6375	0,8543	2,2932
Trimethylamine	0,0216	0,1138	0,1947	0,3863	0,3307	157,6878
Tryptophan	0,0000	0,4131	0,6603	0,8008	0,9757	3,2056
Tyrosine	1,2370	2,7650	4,6320	5,1150	6,3560	14,4240
Uracil	0,3502	1,9167	2,5113	3,3812	4,1340	13,2879
Valerate	0,7787	4,7335	6,2559	7,0181	8,9696	16,1817
Valine	1,6780	4,0640	6,1110	7,2640	8,7580	23,2940
Xanthine	0,0000	0,0000	1,3740	1,9000	2,7330	9,3690
O-Cresol	0,1569	0,2665	0,3652	0,3897	0,4971	0,7401
P-Cresol	0,3227	1,4365	1,8299	2,0910	2,5877	4,6960
Beta-Alanine	0,0000	0,0000	0,1332	0,4388	0,2553	5,0781
2-Hydroxyisobutyrate	0,0000	0,0000	0,0000	0,0012	0,0000	0,0523
Asparagine	0,0000	0,0000	0,0000	0,1008	0,0000	2,6014
Homovanillate	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Tyramine	0,0000	0,0000	0,0000	0,0924	0,0000	4,0664
Urea	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
DSS-D6	13,5800	17,7000	19,8700	21,6000	23,1000	52,4100
pH	5,9600	6,5480	6,8250	6,9550	7,4020	8,1500

Tabla S2. Valores *p* para la prueba estadística Mann-Whitney-Wilcoxon comparando los metabolitos entre grupos de estudio. Se muestran los valores *p* obtenidos tras la prueba Mann-Whitney-Wilcoxon (*p_value*) y los valores *p* ajustados mediante el ajuste de Benjamini-Hochberg (*p_value_adjusted*).

Metabolite	p_value	Adjusted_p_value
2-Aminobutyrate	0,9625	0,9797
3-Phenylpropionate	0,4244	0,9388
4-Aminobutyrate	0,1544	0,7771
Acetate	0,6217	0,9781
Alanine	0,7600	0,9781
Arginine	0,8808	0,9781
Aspartate	0,3846	0,9230
Butyrate	0,4521	0,9388
Caprate	0,0907	0,7771
Choline	0,7600	0,9781
Ethanol	0,7960	0,9781
Formate	0,0409	0,7771
Fumarate	0,1050	0,7771
Glucose	0,6217	0,9781
Glutamate	0,3012	0,9029
Glutamine	0,2045	0,7771
Glycerol	0,1586	0,7771
Glycine	0,9251	0,9781
Histidine	0,1765	0,7771
Isobutyrate	0,1518	0,7771
Isoleucine	0,9438	0,9781
Isopropanol	0,0010	0,0576
Isovalerate	0,1388	0,7771
Lactate	0,0262	0,7468
Leucine	0,8694	0,9781
Lysine	0,9438	0,9781
Malonate	0,7960	0,9781
Methanol	0,5106	0,9388
Methionine	0,8142	0,9781
Methylamine	0,2308	0,8222
N,N-Dimethylglycine	0,8901	0,9781
N-Acetylglycine	0,5106	0,9388
Nicotinate	0,1729	0,7771
O-Phosphocholine	0,3767	0,9230
Phenylacetate	0,1805	0,7771

Phenylalanine	0,9813	0,9813
Proline	0,5413	0,9641
Propionate	0,6384	0,9781
Pyruvate	0,6316	0,9781
Serine	0,7422	0,9781
Succinate	0,8142	0,9781
Taurine	0,3886	0,9230
Threonine	0,9065	0,9781
Thymine	0,2496	0,8369
Trimethylamine	0,2045	0,7771
Tryptophan	0,7245	0,9781
Tyrosine	0,9065	0,9781
Uracil	0,4521	0,9388
Valerate	0,5106	0,9388
Valine	0,9438	0,9781
Xanthine	0,7920	0,9781
o-Cresol	0,6896	0,9781
p-Cresol	0,0821	0,7771
Beta-Alanine	0,3101	0,9029
2-Hydroxyisobutyrate	0,3168	0,9029
Asparagine	0,4846	0,9388
Homovanillate	Na	Na
Tyramine	0,3628	0,9230
Urea	Na	Na

Tabla S3. Los 10 metabolitos que más contribuyen a los dos primeros componentes principales (PC1 y PC2, respectivamente).

Metabolite	PC1_Loading	Metabolite	PC2_Loading
Acetate	0,9049	Malonate	0,8951
Butyrate	0,3423	Butyrate	0,3067
Propionate	0,2211	Trimethylamine	0,2433
Malonate	0,0621	Acetate	-0,1600
Glucose	0,0544	Succinate	-0,1247
Trimethylamine	-0,0417	Glucose	0,0358
Glutamate	0,0394	Propionate	-0,0222
Succinate	0,0350	Lysine	0,0200
Valerate	0,0247	Glutamate	0,0160
Alanine	0,0243	Isovalerate	-0,0159

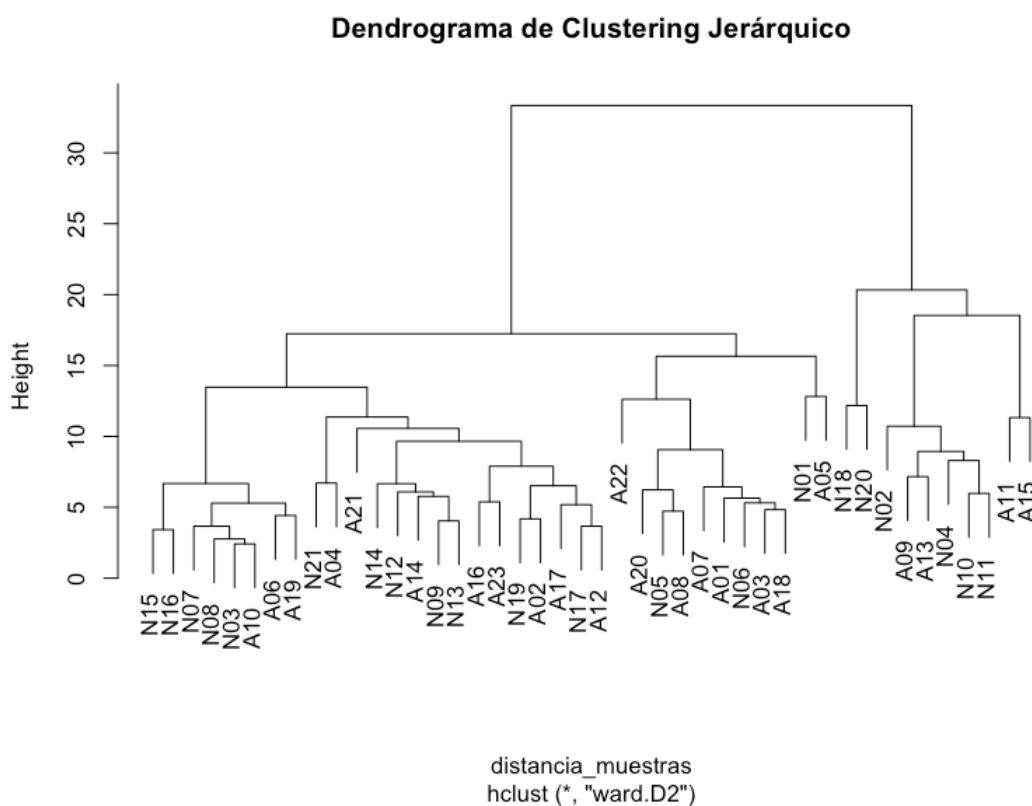


Figura S1. Dendrograma que muestra las distancias entre los individuos del estudio.