

Apartado2_DEGtask

Marcos Rubio Fernandez

2023-April

Sofware utilizado

Para este trabajo se han utilizado las siguientes versiones de R y paquetes de R:

```
## [1] "Versión R: 4.2.2"  
## [1] "Versión DESeq2: 1.38.3"  
## [1] "Versión tidyverse: 2.0.0"  
## [1] "Versión pheatmap: 1.0.12"  
## [1] "Versión RColorBrewer: 1.1.3"  
## [1] "Versión vsn: 3.66.0"
```

Pre-procesado de los datos

Para este análisis partimos de:

1. Matriz de cuentas crudas (“rawcounts.tsv”)
2. Metadatos del experimento (“metadata.tsv”)

Estos datos serán cargados y tratados para que el nombre de las filas de los metadatos (muestras) coincidan con las columnas de la matriz de cuentas.

Adicionalmente crearemos una nueva variable del experimento, la variable `group` que consistirá en la unión de las variables `agent` (tratamiento) y la `time` (tiempo de tratamiento).

```
## [1] "Control24h" "Control48h" "DPN24h"      "DPN48h"      "OHT24h"  
## [6] "OHT48h"
```

Creación de DESeqDataSet

A continuación crearemos el objeto `DESeqDataSet`. Para este objeto, utilizaremos como diseño la modelización por la variable `patient` (paciente) y la variable `group` creada anteriormente. La generación de esta variable nos permite analizar a la vez el tratamiento y el tiempo, en vez de estar utilizando en el diseño la formulación correspondiente la interacción de ambas variables. Se ha decidido realizar esta aproximación siguiendo la recomendación de los autores de `DESeq2` en su apartado Interacciones (<http://bioconductor.org/packages/development/bioc/vignettes/DESeq2/inst/doc/DESeq2.html#interactions>).

```
dds <- DESeqDataSetFromMatrix(countData = counts_data,  
                               colData = experiment_data,  
                               design = ~ patient + group)
```

```
dds
```

```

## class: DESeqDataSet
## dim: 53160 24
## metadata(1): version
## assays(1): counts
## rownames(53160): ENSG000000000003 ENSG000000000005 ... ENSG00000257111
##   ENSG00000257112
## rowData names(0):
## colnames(24): GSM913873 GSM913874 ... GSM913895 GSM913896
## colData names(4): patient agent time group

```

De este data set eliminaremos aquellos genes que tengan un número de lecturas inferior a 10, ya que este filtrado no supone alteración en el estudio estadístico y comprobamos que el número de genes ha disminuido.

```

## [1] "El número de genes incialmente es: 53160"
## [1] "El número de genes tras filtrar aquellos con un número de lecturas > 10 es: 24416"

```

Análisis exploratorio

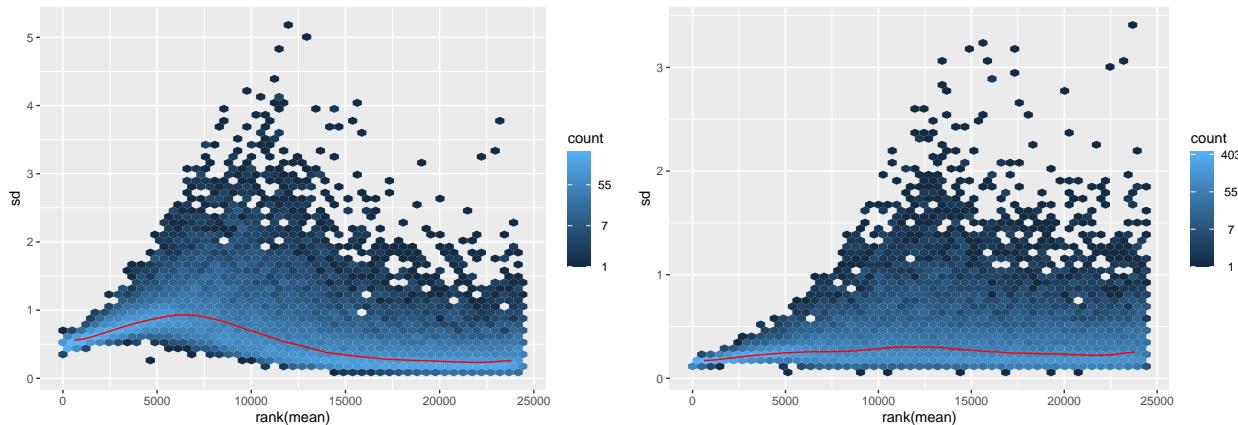
Antes de pasar a realizar la expresión diferencial tenemos que revisar nuestros y datos y la aproximación.

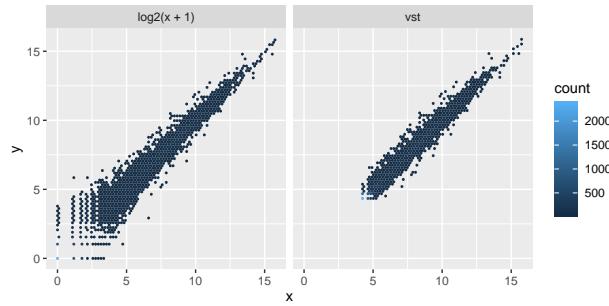
Transformación estabilizadora de la varianza (VST)

Esta función normaliza y estabiliza la varianza de las cuentas (utilizando los size factors), y consiguiendo una matriz que es aproximadamente homocedastica. También tiene en cuenta el tamaño de la librería.

```
vsd <- vst(dds2, blind = TRUE)
```

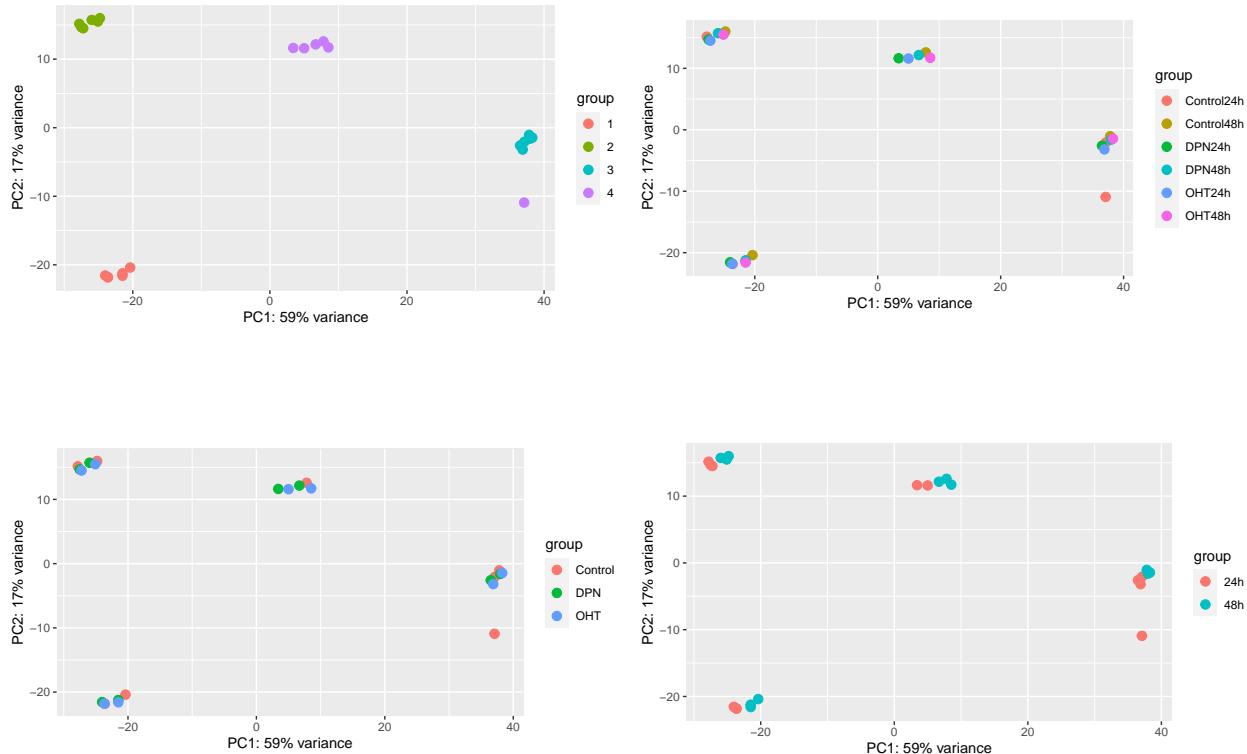
En los siguientes gráficos podemos ver que la estabilización ha ido correctamente ya que la curva (línea roja) de las cuentas (panel izquierdo) se ha aplanoado al transformarse (panel derecho). La tercera figura es una alternativa de ver el resultado de VST con respecto a los valores más pequeños.





Análisis de componentes principales (PCA)

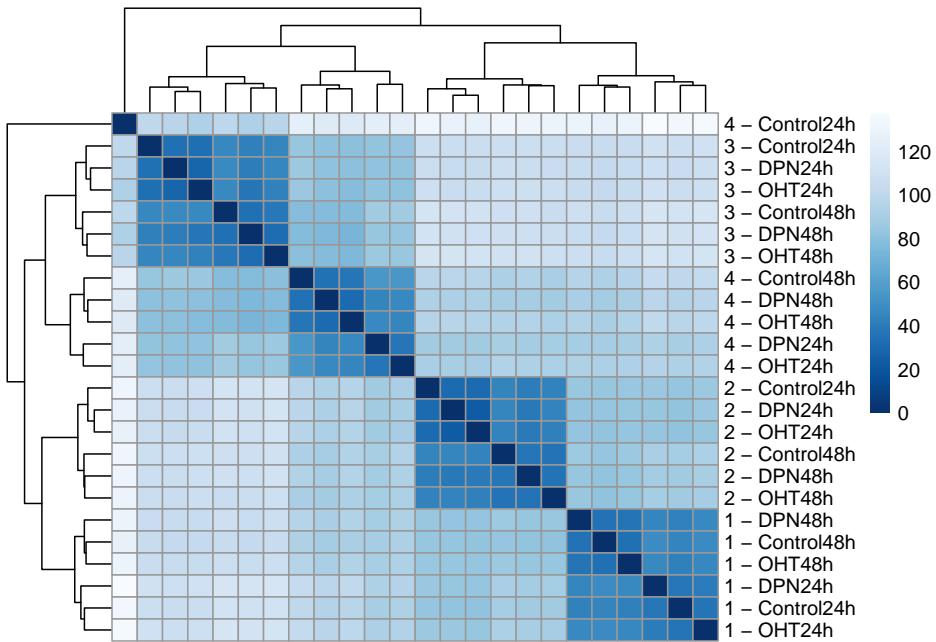
Este objeto vsd nos permite trabajar con unos datos preparados para el análisis de componentes principales y clustering de distancias. A continuación mostramos los resultados gráficos del análisis de componentes principales (PCA), en donde podemos observar que los datos se agrupan por su similitud en relación a los pacientes. El tratamiento y el tiempo no separan los grupos. En los gráficos se aprecia la existencia de un **outlier** correspondiente al *paciente 4*, tratamiento *control* y tiempo *24 horas*.



Matriz de distancias

Alternativamente, podemos comprobar los resultados del PCA mediante una matriz de distancias. En ella podemos ver que los pacientes se agrupan bien entre ellos. En cada paciente los tiempos se agrupan mejor

entre ellos (24h vs 48h). Entre los pacientes parece que los pacientes 1 y 2 serían más cercanos entre si, y por otro lado el 3 y el 4. En relación con el **outlier**, comprobamos su existencia también por este método y vemos que, al igual que demostraba el PCA, se encuentra más cercano a los datos del paciente 3 que a los de su propio grupo.



Análisis de expresión diferencial

Manejo de outlier

Inicialmente vamos a mantener el outlier detectado en el análisis exploratorio. No suele ser una buena práctica mantener este tipo de datos ya que pueden perturbar el resultado en cuanto a los cálculos de expresión diferencial pero creemos, que en una primera aproximación, podría ser más correcto no perder ningún dato ya que este outlier corresponde al único punto que tenemos para esta medición (Paciente 4 - Control - 24 horas). Posteriormente, si se estima necesario repetiremos el análisis eliminando este punto para comprobar si y como varían los resultados.

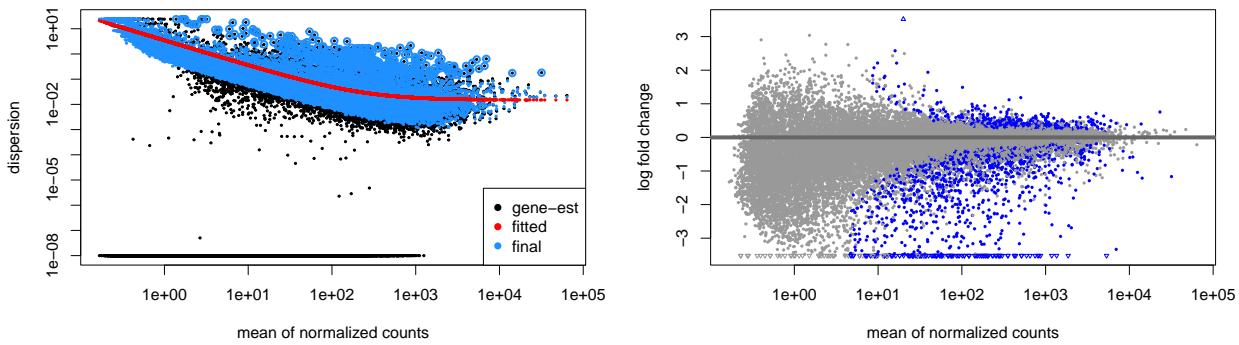
Análisis de expresión diferencial

A continuación creamos un nuevo objeto con la función `DESeq`, la cual lleva a cabo el análisis a través de:

- Estimación de los *size factors*
- Estimación de la dispersión
- Ajuste del modelo de GLM - Binomial negativa, y en este caso el estadístico de Wald.

```
dds3 <- DESeq(dds2, test = "Wald")
```

El gráfico de la izquierda muestra los resultados obtenidos de la dispersión de los datos mediante el método de la máxima probabilidad. Por su parte el gráfico MA-plot de la derecha, nos muestra los resultados de la expresión diferencial dando la variación en log fold de cada gen frente a la media de las cuentas normalizadas, los valores coloreados corresponden con genes diferencialmente expresados.



Efecto del tratamiento con DPN a 24 horas

Para comprobar si el efecto del tratamiento con DPN a 24 horas tiene efecto en la expresión de algunos genes utilizaremos la función `results` del paquete de DESeq2.

```
res_DPN <- results(object = dds3,
                     contrast = c("group", "Control24h", "DPN24h"),
                     alpha = 0.05,
                     pAdjustMethod = "BH"
)
```

En esta función establecemos los diferentes parámetros:

- `object`: identifica el objeto DESeq donde está el modelo ajustado
- `contrast`: las variables que queremos contrastar. En nuestro caso queremos que dentro de la variable `group` compare los datos del `Control24h` con los de `DPN24h`.
- `alpha`: es el valor del nivel de confianza. Lo establecemos en 0,05 % (es decir el 95%).
- `pAdjustMethod`: este análisis nos ofrece el valor de los p-valor para cada gen pero como estamos haciendo múltiples test necesitamos ajustar el p-valor. En este caso aplicamos la corrección de *Benjamini-Hochberg* (BH).

El resultado de este contraste es el que sigue y en ellos podemos ver que el número de genes diferencialmente expresados dado el valor p-valor ajustado < 0.05 es de 87 (74-up, 13-down).

```
##
## out of 24416 with nonzero total read count
## adjusted p-value < 0.05
## LFC > 0 (up)      : 74, 0.3%
## LFC < 0 (down)    : 13, 0.053%
## outliers [1]       : 0, 0%
## low counts [2]     : 10888, 45%
## (mean count < 28)
## [1] see 'cooksCutoff' argument of ?results
## [2] see 'independentFiltering' argument of ?results
```

A continuación podríamos filtrar aquellos genes con un `logFoldChange` (LFC) superior a 1 (incremento de 2 veces) o de 0.585 (incremento de 1,5 veces) que suelen ser los valores más representativos de un cambio en la expresión. Lo que sucede es que este tipo de análisis *post-hoc* no son una buena práctica. Los autores de DESeq2 describen en su artículo esta situación de la siguiente manera:

For well-powered experiments, however, a statistical test against the conventional null hypothesis

of zero LFC may report genes with statistically significant changes that are so weak in effect strength that they could be considered irrelevant or distracting. A common procedure is to disregard genes whose estimated LFC is below some threshold (0). However, this approach loses the benefit of an easily interpretable FDR, as the reported P value and adjusted P value still correspond to the test of zero LFC. It is therefore desirable to include the threshold in the statistical testing procedure directly, i.e., not to filter post hoc on a reported fold-change estimate, but rather to evaluate statistically directly whether there is sufficient evidence that the LFC is above the chosen threshold.

Por lo tanto lo correcto sería incluir el valor de LFC que queremos testar en el análisis de **results**, utilizando la opción **lfcThreshold = 1** y obteniendo el resultado de más abajo. Teniendo en cuenta este filtrado, no obtendríamos ningún gen diferencialmente expresado manteniendo un umbral superior a $LFC > 1$.

'

```
##  
## out of 24416 with nonzero total read count  
## adjusted p-value < 0.05  
## LFC > 1.00 (up) : 0, 0%  
## LFC < -1.00 (down) : 0, 0%  
## outliers [1] : 0, 0%  
## low counts [2] : 0, 0%  
## (mean count < 0)  
## [1] see 'cooksCutoff' argument of ?results  
## [2] see 'independentFiltering' argument of ?results
```

Por otra parte, los mismos autores también refieren los siguiente en el artículo:

For small-scale experiments, statistical significance is often a much stricter requirement than biological significance, thereby relieving the researcher from the need to decide on a threshold for biological significance.

Por lo que consideraremos nuestro experimento como de pequeña escala (bajo número de muestras y bajo número de réplicas por cada una) y continuaremos el análisis con los datos **sin** el filtro de **lfcThreshold**.

Efecto del tratamiento con OHT a 24 horas

A continuación repetiremos el contraste pero esta vez utilizando el segundo tratamiento a 24 horas. En este caso podemos ver en los resultados a continuación que el número de genes (48) es menor que para DPN, siendo 44 up y 4 down para el LFC.

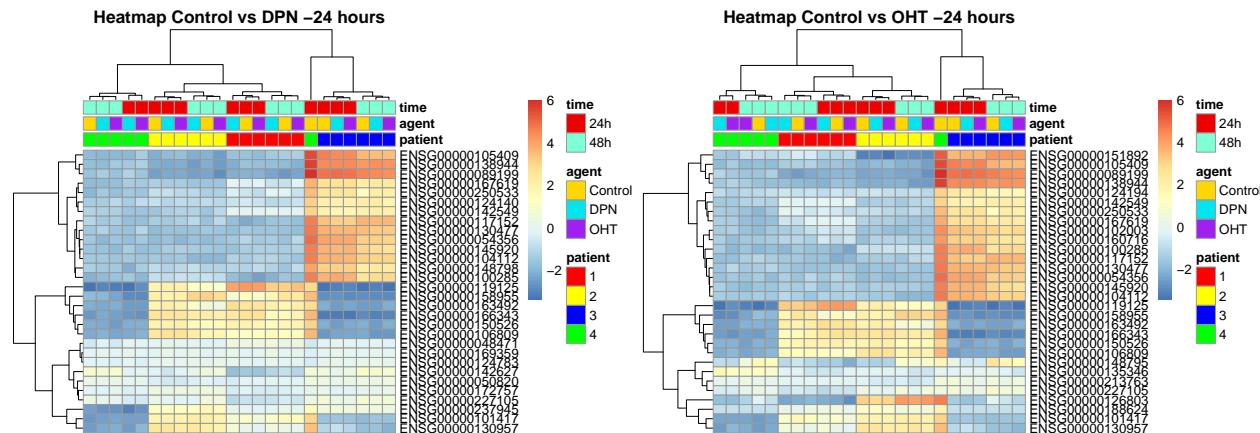
```
res_OHT <- results(object = dds3,  
                     contrast = c("group", "Control24h", "OHT24h"),  
                     alpha = 0.05,  
                     pAdjustMethod = "BH"  
                     )  
  
summary(res_OHT)  
  
##  
## out of 24416 with nonzero total read count  
## adjusted p-value < 0.05  
## LFC > 0 (up) : 44, 0.18%  
## LFC < 0 (down) : 4, 0.016%  
## outliers [1] : 0, 0%  
## low counts [2] : 5681, 23%  
## (mean count < 2)  
## [1] see 'cooksCutoff' argument of ?results  
## [2] see 'independentFiltering' argument of ?results
```

De la misma forma que en el tratamiento anterior, evaluaremos el mismo contraste pero estableciendo el parámetro `lfcThreshold = 1` a priori. Con este filtrado hemos obtenido un único gen diferencialmente expresado (`ENSG00000240864`). Por lo tanto, vamos a actuar de la misma forma que con DPN y utilizaremos los datos del contraste **sin** filtrar por LFC.

```
##
## out of 24416 with nonzero total read count
## adjusted p-value < 0.05
## LFC > 1.00 (up)      : 1, 0.0041%
## LFC < -1.00 (down)   : 0, 0%
## outliers [1]          : 0, 0%
## low counts [2]         : 0, 0%
## (mean count < 0)
## [1] see 'cooksCutoff' argument of ?results
## [2] see 'independentFiltering' argument of ?results
## [1] "El gen que sale significativo es: ENSG00000240864"
```

Visualización resultados

Una forma que tenemos para representar los resultados son los heatmap, en este caso representaremos los 30 genes con menor p-valor ajustado de ambos contrastes, utilizando los resultados **sin** filtro `lfc = 1`.



De estos resultados podemos decir:

- Hay un grupo de genes diferencialmente expresado en el paciente 4 con respecto al resto de pacientes.
- Existe un segundo grupo de genes que está diferencialmente expresado entre los pacientes 1 y 2 con respecto al paciente 4.
- Por su parte el **outlier** presenta una expresión génica (casi) siempre upregulado.

Outlier

Dada la importancia que parece tener este dato, con valores de expresión (diferencial) de los más altos hemos decidido tratar los datos para eliminarlo. Para este tratamiento de datos podríamos optar por dos aproximaciones:

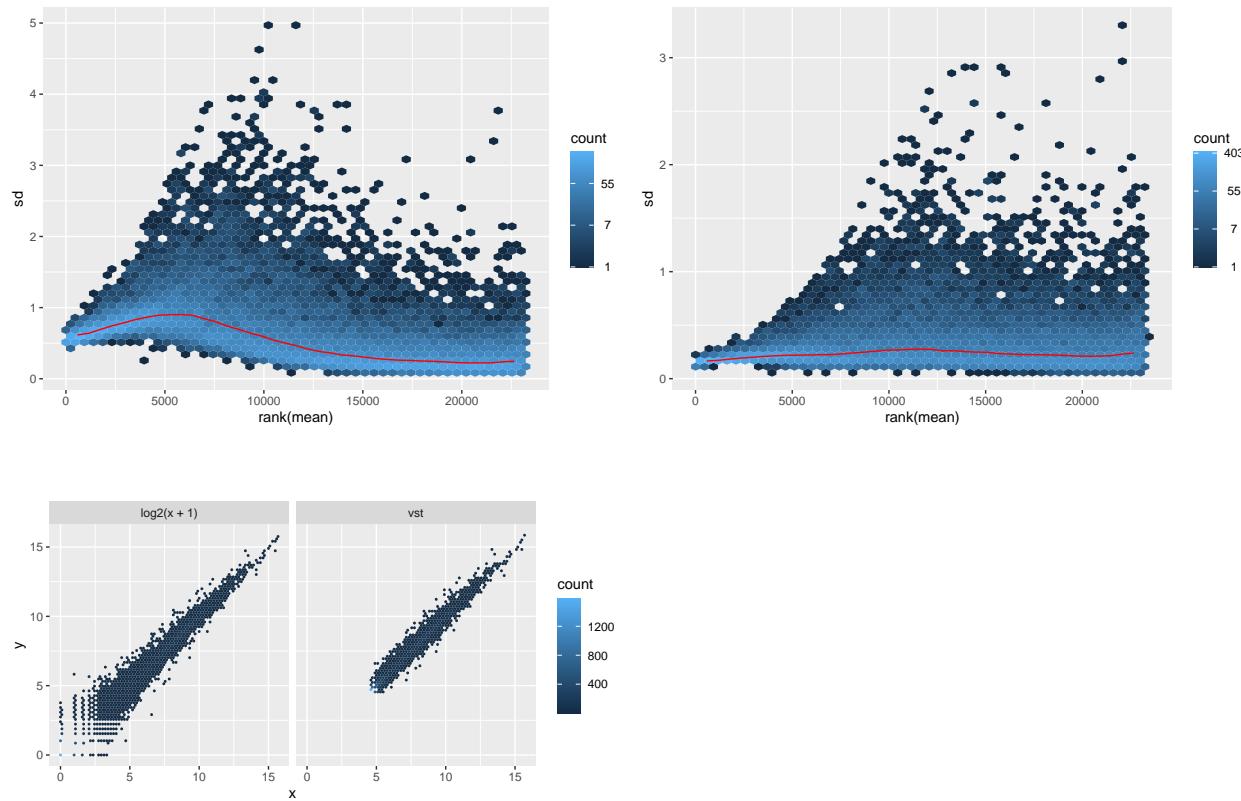
1. Eliminar todos los datos relativos al paciente 4: quizás esta aproximación sería la más conservadora y correcta viendo el diseño experimental donde no tenemos más que una réplica por condición. Por lo que haciendo esto no dejariamos “descolgadas” las comparaciones de los tratamientos.
2. Eliminar únicamente el dato **outlier**, correspondiente con el paciente 4, tratamiento control y tiempo 24 horas.

Para este ejercicio hemos decidido realizar esta última, aunque como comentamos puede que no sea lo idóneo pero así podemos evaluar (o eso creo) la influencia de este dato sobre el resto del análisis mientras que si eliminamos el grupo entero no podríamos evaluarlo de manera tan concreta.

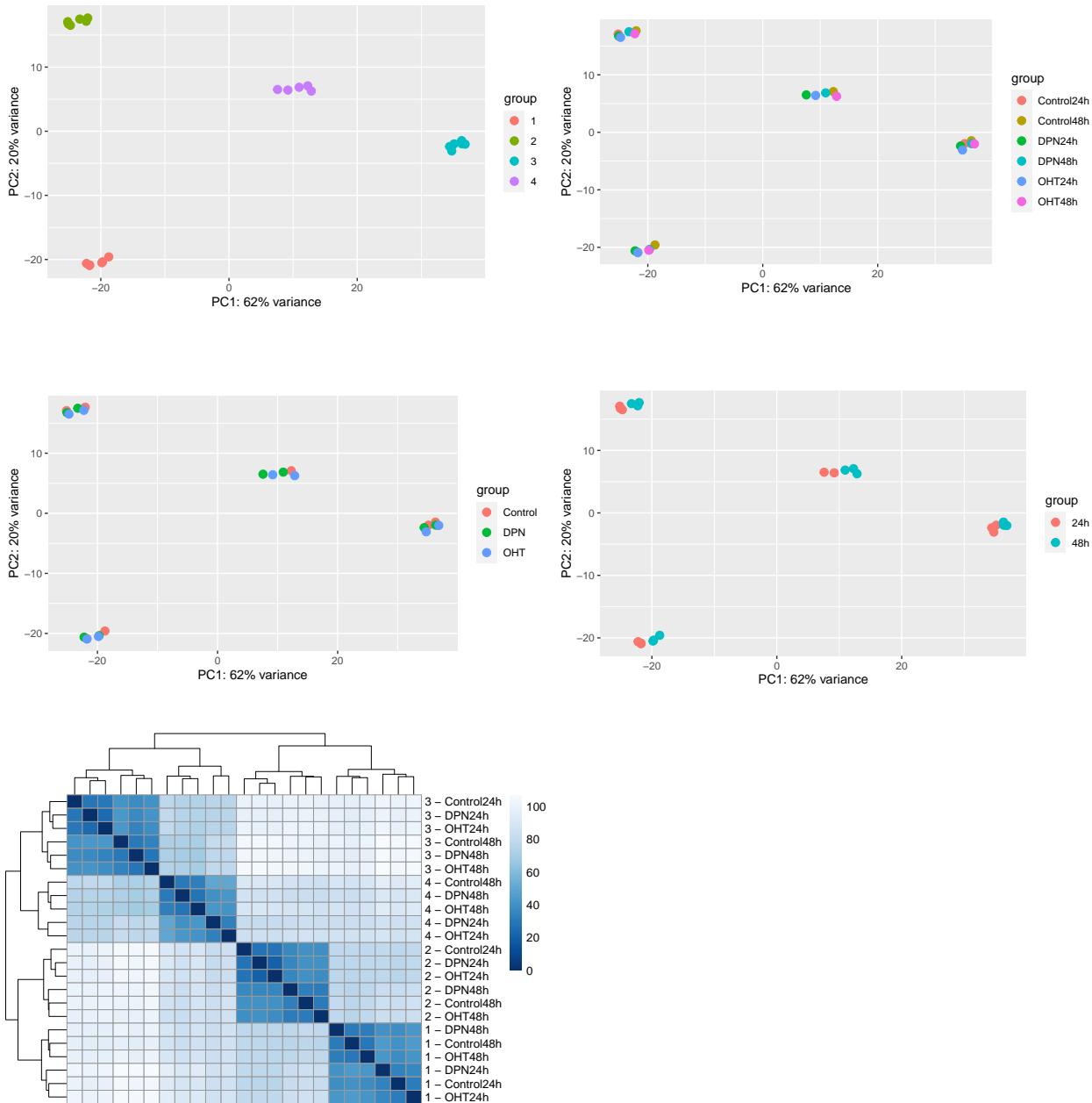
Creamos nuestro `DESeqDataSet` con nuevas matrices de cuentas y metadatos sin el outlier, como diseño mantenemos `design = ~ patient + group`. Filtraremos las cuentas con valores menores de 10. Como en el anterior análisis vemos la reducción (casi a la mitad) en el número de genes.

```
## class: DESeqDataSet
## dim: 53160 23
## metadata(1): version
## assays(1): counts
## rownames(53160): ENSG00000000003 ENSG00000000005 ... ENSG00000257111
##   ENSG00000257112
## rowData names(0):
## colnames(23): GSM913873 GSM913874 ... GSM913894 GSM913895
## colData names(4): patient agent time group
## [1] "El número de genes inicialmente es: 53160"
## [1] "El número de genes tras filtrar aquellos con un número de lecturas > 10 es: 23233"
```

Procedemos con la **transformación estabilizadora de la varianza (VST)**, y mediante los gráficos construidos comprobamos que ha sucedido correctamente.

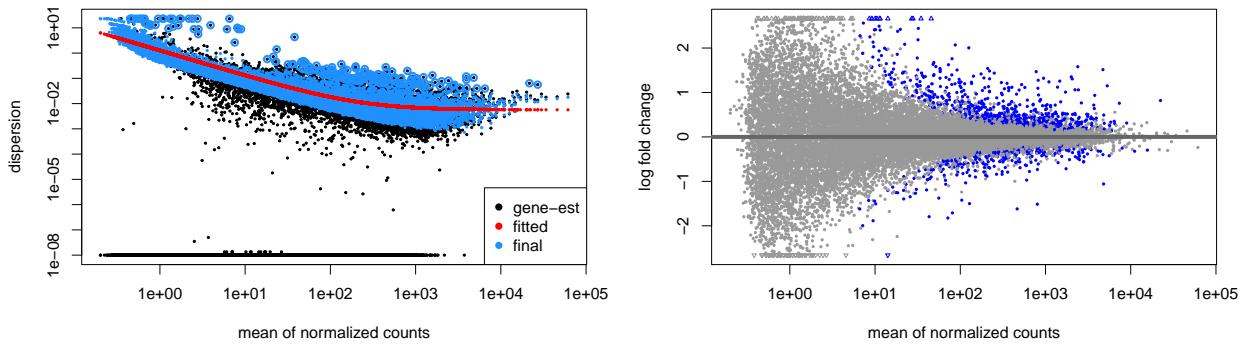


Una vez realizado esto comprobamos de nuevo el **análisis de componentes principales (PCA)** y la **matriz de distancias**, en los cuales vemos que la separación se sigue manteniendo por pacientes pero ya no existe el outlier.



El siguiente paso que haremos es crear nuestro objeto DESeq y comprobar graficamente la distribución de la estimación de la dispersión así como los resultados de la expresión diferencial en el **MA-plot**. De este último podemos resaltar que es diferente con respecto al primer MA-plot obtenido (ver resultados anteriores). En el anterior análisis, muchos de los genes con pvalores significativos se localizan en rangos de logFoldChange negativos, además de ser mucho más abundantes, en este nuevo análisis la mayoría de esos genes con LFC negativo han desaparecido. Esto puede ser indicativo de la influencia que tenia este outlier dentro del análisis de expresión diferencial.

```
dds3_outlier <- DESeq(dds2_outlier, test = "Wald")
```



A continuación analizamos los resultados del contraste del **tratamiento con DPN a 24 horas**, y lo que podemos observar es que el número de genes se ha reducido drásticamente tras eliminar este outlier (pasado de casi 90 a 5).

```
## [1] "Summary Control-DPN24h sin lfcThreshold"
##
## out of 23233 with nonzero total read count
## adjusted p-value < 0.05
## LFC > 0 (up)      : 3, 0.013%
## LFC < 0 (down)    : 2, 0.0086%
## outliers [1]       : 0, 0%
## low counts [2]     : 0, 0%
## (mean count < 0)
## [1] see 'cooksCutoff' argument of ?results
## [2] see 'independentFiltering' argument of ?results
## [1] "Summary Control-DPN24h, lfcThreshold = 1"
##
## out of 23233 with nonzero total read count
## adjusted p-value < 0.05
## LFC > 1.00 (up)   : 0, 0%
## LFC < -1.00 (down) : 0, 0%
## outliers [1]       : 0, 0%
## low counts [2]     : 0, 0%
## (mean count < 0)
## [1] see 'cooksCutoff' argument of ?results
## [2] see 'independentFiltering' argument of ?results
```

Asimismo, para el **tratamiento con OHT a 24 horas**, la reducción es igual llegando incluso en este caso a no aparecer ningún gen diferencialmente expresado (tanto con como sin filtro por LFC).

```
## [1] "Summary Control-OHT24h sin lfcThreshold"
##
## out of 23233 with nonzero total read count
## adjusted p-value < 0.05
## LFC > 0 (up)      : 0, 0%
```

```

## LFC < 0 (down)      : 0, 0%
## outliers [1]        : 0, 0%
## low counts [2]       : 0, 0%
## (mean count < 0)
## [1] see 'cooksCutoff' argument of ?results
## [2] see 'independentFiltering' argument of ?results

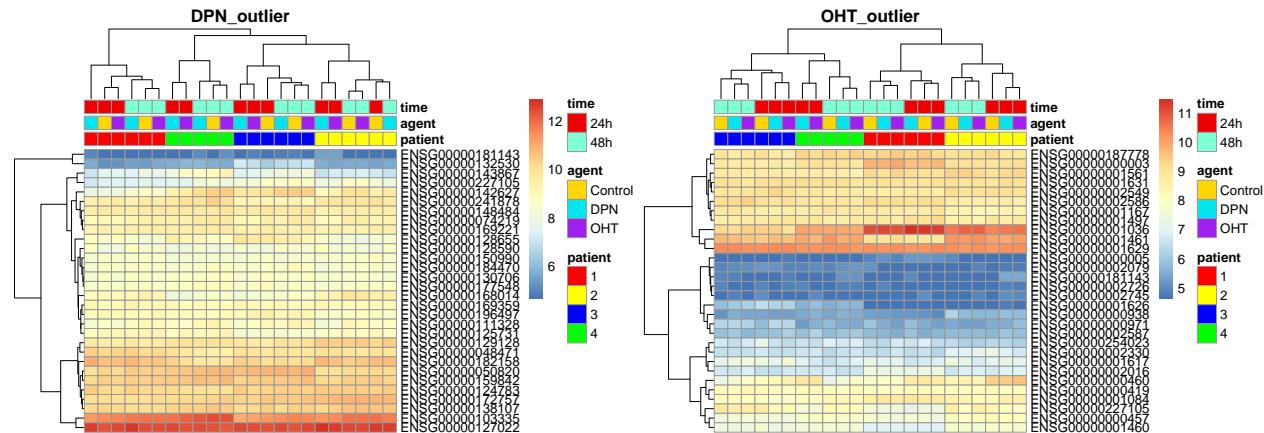
## [1] "Summary Control-OHT24h, lfcThreshold = 1"

##
## out of 23233 with nonzero total read count
## adjusted p-value < 0.05
## LFC > 1.00 (up)      : 0, 0%
## LFC < -1.00 (down)   : 0, 0%
## outliers [1]          : 0, 0%
## low counts [2]         : 0, 0%
## (mean count < 0)
## [1] see 'cooksCutoff' argument of ?results
## [2] see 'independentFiltering' argument of ?results

```

Visualización resultados

Este efecto de reducción en los genes que antes se detallaban como diferencialmente expresados también se puede observar en los heatmap, en ellos tras eliminar el outlier no aparecen grupos de genes diferencialmente expresados.



Conclusiones

- El análisis preliminar de los datos de este experimento nos indica que las diferencias en la expresión génica que se podrían observar en los datos están siendo debidas principalmente a las diferencias individuales entre los pacientes en lugar de las diferencias debidas a los tratamientos o tiempos. Esto puede ser una indicación de que hay una alta variabilidad entre los pacientes que está afectando los resultados, aunque esto no necesariamente significa que los tratamientos y tiempos no tengan efectos significativos en la expresión génica.
- El análisis con DESeq2 muestra una cantidad baja de genes diferencialmente expresados con ambos tratamientos a 24 horas: 87 para DPN y 48 para OHT. Este número suele ser más elevado teniendo en cuenta la gran cantidad de genes que tenemos. Aun con ello, si nos fijamos en las aproximaciones que nos da heatmap para los genes *top* podemos ver que la agrupación de estos genes no se produce por los

tratamientos ni por los tiempos (lo que corrobora PCA), si no que se agrupan por los pacientes. No encontrándose por lo tanto genes diferencialmente expresados debido a alguna de estas variables.

3. El tratamiento de los datos para eliminar un outlier del paciente 4 hace que todo el análisis de DEGs desaparezca, no encontrándose (casi) ningún gen ya diferencialmente expresado entre pacientes ni entre condiciones. Esto podría ser indicativo de la influencia que tenían los datos de este paciente. Una solución podría ser incluir un mayor número de pacientes y replicas de cada condición por paciente (ahora mismo solo tenemos un dato por condición y paciente).

Respuesta a la pregunta planteada

Pregunta 4 (3 puntos): ¿Qué genes se encuentran diferencialmente expresados entre las muestras pertenecientes al grupo tratado con OHT con respecto al control tras 24h? ¿Y en el caso de las muestras tratadas con DPN, también tras 24h? Como parte de la respuesta a esta pregunta, podéis entregar una o más tablas adjuntas donde se incluyan los genes diferencialmente expresados, indicando el criterio o los criterios que habéis seguido para filtrar los resultados, así como cualquier otro gráfico o gráficos que hayáis elaborado durante el análisis.

Aunque hemos ido respondiendo a esta pregunta a lo largo del escrito, a continuación mostraremos las tablas correspondientes de los genes que han aparecido diferencialmente expresados bajo el criterio de **p-valor ajustado (padj) < 0.05**. Únicamente vamos a mostrar las tablas que han salido con más genes (con el outlier y sin filtro de lfcThreshold).

Control vs DPN tratamiento 24 horas

	baseMean	log2FoldChange	lfcSE	stat	pvalue
## ENSG00000050820	1500.20251	0.3035073	0.06504031	4.666449	3.064494e-06
## ENSG00000101417	259.67642	5.4027104	1.15456674	4.679427	2.876782e-06
## ENSG00000105409	652.62555	6.4609432	1.37769008	4.689693	2.736155e-06
## ENSG00000138944	806.33463	6.0212515	1.30386579	4.617999	3.874572e-06
## ENSG00000142627	810.09187	0.5137021	0.10922097	4.703329	2.559540e-06
## ENSG00000145920	289.56875	6.1137656	1.31437726	4.651454	3.296026e-06
## ENSG00000169359	483.87865	-0.3351788	0.07214934	-4.645626	3.390475e-06
## ENSG00000172757	1419.03914	0.2519971	0.05199844	4.846243	1.258211e-06
## ENSG00000054356	427.30089	5.4698086	1.19818488	4.565079	4.993064e-06
## ENSG00000150526	201.95922	6.1667992	1.38200950	4.462197	8.112345e-06
## ENSG00000124783	1251.75851	-0.2390768	0.05387952	-4.437249	9.111579e-06
## ENSG00000089199	1858.61852	4.7432085	1.08480764	4.372396	1.228904e-05
## ENSG00000119125	870.12872	6.8002055	1.55730579	4.366648	1.261681e-05
## ENSG00000158955	516.61104	5.2544471	1.19804387	4.385855	1.155309e-05
## ENSG00000124140	57.46108	5.8983251	1.36981569	4.305926	1.662886e-05
## ENSG00000130477	515.28626	4.3981123	1.03502412	4.249285	2.144541e-05
## ENSG00000130957	208.24977	5.7286108	1.34672752	4.253727	2.102419e-05
## ENSG00000227105	253.07075	0.5608877	0.13181062	4.255254	2.088116e-05
## ENSG00000148798	189.80995	5.0115008	1.18498924	4.229153	2.345728e-05
## ENSG00000100285	355.70806	5.5870430	1.34536928	4.152795	3.284388e-05
## ENSG00000106809	253.17138	5.8617775	1.39568360	4.199933	2.669940e-05
## ENSG00000117152	592.23447	4.4182562	1.06425631	4.151496	3.303085e-05
## ENSG00000142549	68.11600	5.9774238	1.44184235	4.145685	3.387998e-05
## ENSG00000163492	230.89280	5.8951898	1.41776138	4.158097	3.209093e-05
## ENSG00000166343	828.90024	4.2845555	1.02354818	4.185983	2.839344e-05
## ENSG00000167619	181.37587	4.5825100	1.10183740	4.158971	3.196842e-05
## ENSG00000250533	121.39723	5.1601221	1.23374614	4.182483	2.883427e-05
## ENSG00000048471	981.24634	-0.2715638	0.06641522	-4.088879	4.334624e-05
## ENSG00000237945	199.92888	4.5245107	1.10475920	4.095472	4.213086e-05

## ENSG00000104112	275.70047	5.5863493	1.37216317	4.071199	4.677177e-05
## ENSG00000147003	290.42607	4.0827487	1.00453969	4.064298	4.817723e-05
## ENSG00000188293	34.10307	4.6481853	1.14016142	4.076778	4.566399e-05
## ENSG00000250120	141.89840	4.6593150	1.15181987	4.045177	5.228365e-05
## ENSG00000151892	1183.23045	4.4223243	1.10078239	4.017437	5.883446e-05
## ENSG00000196497	465.33222	0.2960400	0.07398442	4.001383	6.297346e-05
## ENSG00000157064	748.81778	3.9671449	0.99438124	3.989561	6.619562e-05
## ENSG00000196154	118.99446	1.7520093	0.44151933	3.968137	7.243662e-05
## ENSG00000197635	1353.35945	3.8914242	0.97973620	3.971910	7.129859e-05
## ENSG00000205056	42.32140	3.0430869	0.76865522	3.958975	7.527206e-05
## ENSG00000077063	278.74201	-0.6126437	0.15615425	-3.923324	8.733564e-05
## ENSG00000125753	826.81888	0.3739317	0.09488776	3.940779	8.121737e-05
## ENSG00000150672	439.77591	3.8106795	0.97113552	3.923942	8.711169e-05
## ENSG00000169228	124.64621	0.5443613	0.13832531	3.935371	8.306844e-05
## ENSG00000196090	353.73985	6.0571168	1.54348214	3.924319	8.697531e-05
## ENSG00000160716	171.41424	5.3815999	1.37440061	3.915598	9.018050e-05
## ENSG00000069535	178.94593	4.0229541	1.03542489	3.885317	1.021964e-04
## ENSG00000138083	191.55805	5.5028041	1.41030687	3.901849	9.546079e-05
## ENSG00000162692	146.37767	3.9793530	1.01821160	3.908179	9.299448e-05
## ENSG00000163017	42.51451	5.2883478	1.36076023	3.886319	1.017759e-04
## ENSG00000176406	122.23367	5.1474072	1.32064641	3.897642	9.713377e-05
## ENSG00000185275	303.36901	4.2466001	1.09352847	3.883392	1.030092e-04
## ENSG00000171450	68.11127	5.8969223	1.52039388	3.878549	1.050813e-04
## ENSG00000003137	726.90225	2.8208637	0.73060047	3.861021	1.129142e-04
## ENSG00000126803	1507.73068	3.6304041	0.94123810	3.857052	1.147629e-04
## ENSG00000157551	244.45401	2.8208419	0.72993738	3.864499	1.113177e-04
## ENSG00000099194	4929.51885	-0.5632707	0.14651643	-3.844420	1.208381e-04
## ENSG00000230657	69.46532	7.6391472	1.98767281	3.843262	1.214098e-04
## ENSG00000102003	421.80279	3.7976323	0.99246968	3.826447	1.300063e-04
## ENSG00000126259	90.05402	4.8540173	1.26672492	3.831943	1.271354e-04
## ENSG00000232310	101.05430	4.0483973	1.05785169	3.826999	1.297151e-04
## ENSG00000148795	97.88949	2.2444954	0.58897661	3.810840	1.384956e-04
## ENSG00000111846	80.47004	3.2191467	0.84642262	3.803238	1.428170e-04
## ENSG00000157766	59.16307	2.6057855	0.68883184	3.782905	1.550085e-04
## ENSG00000124194	56.74816	4.4220144	1.17018024	3.778917	1.575117e-04
## ENSG00000164946	93.14601	4.8566384	1.28855527	3.769057	1.638654e-04
## ENSG00000215105	601.34751	-0.2388237	0.06341347	-3.766135	1.657942e-04
## ENSG00000108309	235.71693	3.4799336	0.92494231	3.762325	1.683411e-04
## ENSG00000198040	325.70826	-0.4186473	0.11175468	-3.746128	1.795851e-04
## ENSG00000160336	189.32943	-0.4562411	0.12197524	-3.740440	1.836981e-04
## ENSG00000120129	1054.10947	0.4410973	0.11827944	3.729281	1.920266e-04
## ENSG00000176153	86.26241	4.2585810	1.14697447	3.712882	2.049123e-04
## ENSG00000188931	150.51652	-0.4277367	0.11520144	-3.712946	2.048609e-04
## ENSG00000197496	431.38793	-0.3077528	0.08325461	-3.696526	2.185696e-04
## ENSG00000078053	54.87585	2.9538025	0.80413806	3.673253	2.394822e-04
## ENSG00000092140	209.15372	-0.3438803	0.09343888	-3.680270	2.329874e-04
## ENSG00000163531	253.58215	3.5962502	0.97858876	3.674935	2.379099e-04
## ENSG00000169239	990.99778	2.9631283	0.80733219	3.670271	2.422930e-04
## ENSG00000251022	82.71379	-0.6151429	0.16868725	-3.646647	2.656840e-04
## ENSG00000223496	153.26265	0.4475657	0.12340292	3.626864	2.868839e-04
## ENSG00000237149	78.62700	1.3318243	0.36737221	3.625272	2.886572e-04
## ENSG00000105270	283.13655	1.3626875	0.37639702	3.620346	2.942093e-04
## ENSG00000075461	153.11006	4.5199069	1.25424469	3.603688	3.137333e-04
## ENSG00000108753	120.96221	4.8759119	1.35071679	3.609870	3.063506e-04

```

## ENSG00000114331 660.19074 -0.2575618 0.07141678 -3.606460 3.104026e-04
## ENSG00000130558 278.24861 3.2176167 0.89133078 3.609902 3.063128e-04
## ENSG00000231824 76.54631 5.0791496 1.40814812 3.606971 3.097922e-04
## ENSG00000180801 273.36806 3.3917956 0.94244668 3.598926 3.195345e-04
##                               padj
## ENSG00000050820 0.006551901
## ENSG00000101417 0.006551901
## ENSG00000105409 0.006551901
## ENSG00000138944 0.006551901
## ENSG00000142627 0.006551901
## ENSG00000145920 0.006551901
## ENSG00000169359 0.006551901
## ENSG00000172757 0.006551901
## ENSG00000054356 0.007505129
## ENSG00000150526 0.010974380
## ENSG00000124783 0.011205586
## ENSG00000089199 0.012191441
## ENSG00000119125 0.012191441
## ENSG00000158955 0.012191441
## ENSG00000124140 0.014997013
## ENSG00000130477 0.016117416
## ENSG00000130957 0.016117416
## ENSG00000227105 0.016117416
## ENSG00000148798 0.016701580
## ENSG00000100285 0.016975123
## ENSG00000106809 0.016975123
## ENSG00000117152 0.016975123
## ENSG00000142549 0.016975123
## ENSG00000163492 0.016975123
## ENSG00000166343 0.016975123
## ENSG00000167619 0.016975123
## ENSG00000250533 0.016975123
## ENSG00000048471 0.020220272
## ENSG00000237945 0.020220272
## ENSG00000104112 0.020366923
## ENSG00000147003 0.020366923
## ENSG00000188293 0.020366923
## ENSG00000250120 0.021433127
## ENSG00000151892 0.023409192
## ENSG00000196497 0.024340142
## ENSG00000157064 0.024874844
## ENSG00000196154 0.025787438
## ENSG00000197635 0.025787438
## ENSG00000205056 0.026109756
## ENSG00000077063 0.026851739
## ENSG00000125753 0.026851739
## ENSG00000150672 0.026851739
## ENSG00000169228 0.026851739
## ENSG00000196090 0.026851739
## ENSG00000160716 0.027110264
## ENSG00000069535 0.027323687
## ENSG00000138083 0.027323687
## ENSG00000162692 0.027323687
## ENSG00000163017 0.027323687

```

```

## ENSG00000176406 0.027323687
## ENSG00000185275 0.027323687
## ENSG00000171450 0.027337312
## ENSG00000003137 0.028227492
## ENSG00000126803 0.028227492
## ENSG00000157551 0.028227492
## ENSG00000099194 0.028814588
## ENSG00000230657 0.028814588
## ENSG00000102003 0.029312090
## ENSG00000126259 0.029312090
## ENSG00000232310 0.029312090
## ENSG00000148795 0.030714241
## ENSG00000111846 0.031161743
## ENSG00000157766 0.033285001
## ENSG00000124194 0.033294039
## ENSG00000164946 0.033982777
## ENSG00000215105 0.033982777
## ENSG00000108309 0.033989820
## ENSG00000198040 0.035726862
## ENSG00000160336 0.036015474
## ENSG00000120129 0.037110505
## ENSG00000176153 0.038500750
## ENSG00000188931 0.038500750
## ENSG00000197496 0.040504247
## ENSG00000078053 0.042568048
## ENSG00000092140 0.042568048
## ENSG00000163531 0.042568048
## ENSG00000169239 0.042568048
## ENSG00000251022 0.046079145
## ENSG00000223496 0.048811935
## ENSG00000237149 0.048811935
## ENSG00000105270 0.049136584
## ENSG00000075461 0.049350976
## ENSG00000108753 0.049350976
## ENSG00000114331 0.049350976
## ENSG00000130558 0.049350976
## ENSG00000231824 0.049350976
## ENSG00000180801 0.049685776

```

Control vs OHT tratamiento 24 horas

	baseMean	log2FoldChange	lfcSE	stat	pvalue
## ENSG00000054356	427.300888	5.6243368	1.20073649	4.684073	2.812304e-06
## ENSG00000101417	259.676420	5.5104872	1.15532216	4.769654	1.845424e-06
## ENSG00000135346	8.928703	-3.3834816	0.72638437	-4.657977	3.193321e-06
## ENSG00000158955	516.611036	5.5714147	1.19329713	4.668925	3.027800e-06
## ENSG00000100285	355.708055	6.2327666	1.35872951	4.587202	4.492262e-06
## ENSG00000130957	208.249775	6.1320207	1.35115739	4.538347	5.669698e-06
## ENSG00000145920	289.568750	5.9141375	1.31096770	4.511276	6.443872e-06
## ENSG00000250533	121.397231	5.6452663	1.24226345	4.544339	5.510789e-06
## ENSG00000105409	652.625554	6.1331940	1.37309105	4.466706	7.943318e-06
## ENSG00000148795	97.889488	2.6428663	0.59690842	4.427591	9.529139e-06
## ENSG00000089199	1858.618515	4.7417864	1.08445436	4.372509	1.228268e-05
## ENSG00000213763	122.656737	0.6094450	0.13942982	4.370980	1.236899e-05

```

## ENSG00000227105 253.070748    0.5733344 0.13125867 4.367973 1.254049e-05
## ENSG00000117152 592.234472    4.5004685 1.06460181 4.227373 2.364360e-05
## ENSG00000126803 1507.730679    3.9819997 0.94220737 4.226246 2.376227e-05
## ENSG00000150526 201.959224    5.7122188 1.35215103 4.224542 2.394272e-05
## ENSG00000151892 1183.230448    4.7140274 1.10589097 4.262651 2.020158e-05
## ENSG00000167619 181.375869    4.7085129 1.10383603 4.265591 1.993738e-05
## ENSG00000188624 14.358130     5.6960462 1.35220268 4.212420 2.526488e-05
## ENSG00000102003 421.802789    4.0616479 0.99388901 4.086621 4.377010e-05
## ENSG00000104112 275.700473    5.5106836 1.37072396 4.020272 5.813090e-05
## ENSG00000106809 253.171384    5.6242444 1.37305555 4.096152 4.200739e-05
## ENSG00000119125 870.128716    6.2836316 1.53074440 4.104952 4.043997e-05
## ENSG00000124194 56.748156     4.7721493 1.18464598 4.028334 5.617358e-05
## ENSG00000130477 515.286256    4.1650997 1.03232597 4.034675 5.467795e-05
## ENSG00000138944 806.334629    5.2619439 1.27949897 4.112503 3.913917e-05
## ENSG00000142549 68.115999     5.7753172 1.43744228 4.017773 5.875068e-05
## ENSG00000160716 171.414239    5.5488411 1.37829944 4.025860 5.676737e-05
## ENSG00000163492 230.892797    5.8303383 1.40974560 4.135738 3.538158e-05
## ENSG00000166343 828.900242    4.1486560 1.01991777 4.067638 4.749213e-05
## ENSG00000197635 1353.359455   3.9852114 0.97885105 4.071315 4.674839e-05
## ENSG00000198502 35.342116     -1.7942682 0.44518805 -4.030360 5.569143e-05
## ENSG00000230657 69.465315     8.0371572 1.99951399 4.019555 5.830807e-05
## ENSG00000237945 199.928876    4.5402530 1.10646039 4.103403 4.071170e-05
## ENSG00000069535 178.945930    4.1114155 1.03472939 3.973421 7.084765e-05
## ENSG00000129993 9.853864      -2.6898236 0.67469467 -3.986727 6.699096e-05
## ENSG00000164946 93.146013     5.1149634 1.28487417 3.980906 6.865308e-05
## ENSG00000231824 76.546313     5.6808185 1.42974062 3.973321 7.087741e-05
## ENSG00000250120 141.898399    4.5551146 1.15216669 3.953520 7.700968e-05
## ENSG00000150672 439.775907    3.8286625 0.97067673 3.944323 8.002575e-05
## ENSG00000196090 353.739854    6.0674204 1.54344066 3.931101 8.455789e-05
## ENSG00000172757 1419.039144   0.2008325 0.05155435 3.895550 9.797613e-05
## ENSG00000228887 270.154828    0.3586261 0.09198046 3.898938 9.661566e-05
## ENSG00000251022 82.713786     -0.6492787 0.16705736 -3.886562 1.016741e-04
## ENSG00000124140 57.461079     5.1554618 1.33160798 3.871606 1.081205e-04
## ENSG00000135447 345.593059    0.8422803 0.21726802 3.876688 1.058881e-04
## ENSG00000148798 189.809947    4.5573268 1.17910680 3.865067 1.110587e-04
## ENSG00000185275 303.369005    4.1940456 1.09349819 3.835439 1.253402e-04
## padj
## ENSG0000054356 0.01495672
## ENSG00000101417 0.01495672
## ENSG00000135346 0.01495672
## ENSG00000158955 0.01495672
## ENSG00000100285 0.01509074
## ENSG00000130957 0.01509074
## ENSG00000145920 0.01509074
## ENSG00000250533 0.01509074
## ENSG00000105409 0.01653534
## ENSG00000148795 0.01785284
## ENSG00000089199 0.01807277
## ENSG00000213763 0.01807277
## ENSG00000227105 0.01807277
## ENSG00000117152 0.02491250
## ENSG00000126803 0.02491250
## ENSG00000150526 0.02491250
## ENSG00000151892 0.02491250

```

```
## ENSG00000167619 0.02491250
## ENSG00000188624 0.02491250
## ENSG00000102003 0.03237335
## ENSG00000104112 0.03237335
## ENSG00000106809 0.03237335
## ENSG00000119125 0.03237335
## ENSG00000124194 0.03237335
## ENSG00000130477 0.03237335
## ENSG00000138944 0.03237335
## ENSG00000142549 0.03237335
## ENSG00000160716 0.03237335
## ENSG00000163492 0.03237335
## ENSG00000166343 0.03237335
## ENSG00000197635 0.03237335
## ENSG00000198502 0.03237335
## ENSG00000230657 0.03237335
## ENSG00000237945 0.03237335
## ENSG00000069535 0.03494443
## ENSG00000129993 0.03494443
## ENSG00000164946 0.03494443
## ENSG00000231824 0.03494443
## ENSG00000250120 0.03699427
## ENSG00000150672 0.03748206
## ENSG00000196090 0.03863883
## ENSG00000172757 0.04268797
## ENSG00000228887 0.04268797
## ENSG00000251022 0.04329237
## ENSG00000124140 0.04403560
## ENSG00000135447 0.04403560
## ENSG00000148798 0.04426989
## ENSG00000185275 0.04892185
```