# Expresión diferencial con datos RNA-seq

Guillermo Ayala Gallego

2025-05-21

## Table of contents

# Introducción

## Paquetes

```
pacman::p_load(SummarizedExperiment,edgeR,ggplot2)
```

## Data

```
data(PRJNA297664,package="tamidata")
```

```
colData(PRJNA297664)[,"treatment"]
```

```
[1] Wild           Wild           SEC66 deletion Wild           SEC66 deletion
[6] SEC66 deletion
Levels: Wild SEC66 deletion
```

# Una muestra por condición

## Un test para comparar proporciones

- Queremos comparar dos condiciones y disponemos de una muestra en cada una de las condiciones.
- En este caso para cada gen tendríamos una tabla $2 \times 2$ como

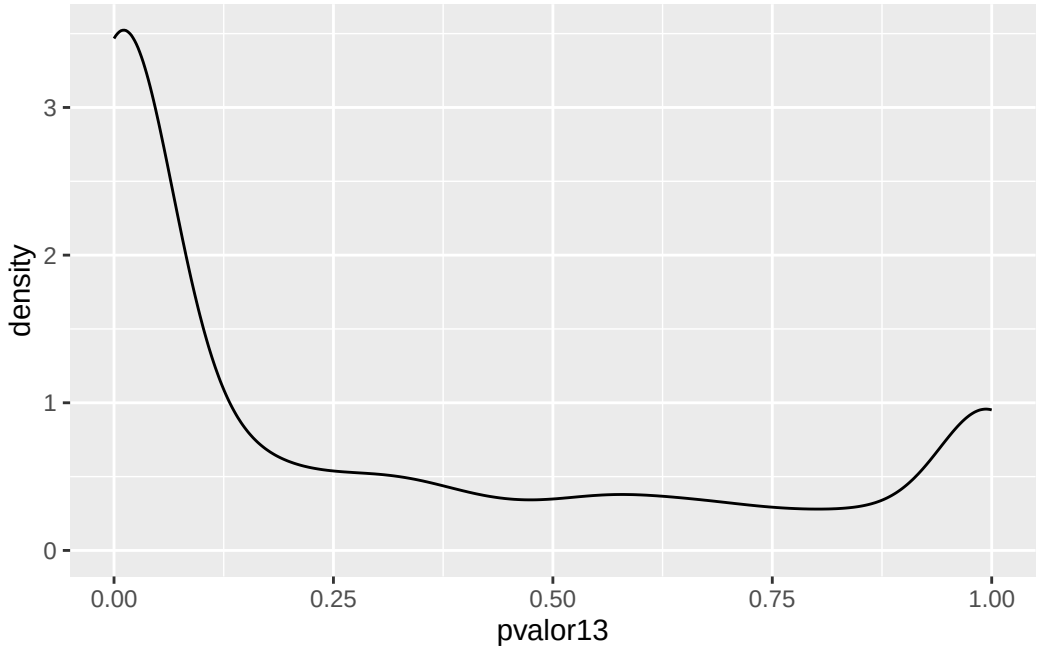
| Muestra | Gen | Resto | Total |
|---|---|---|---|
| 1 | $y_1$ | $m_1 - y_1$ | $m_1$ |
| 2 | $y_2$ | $m_2 - y_2$ | $m_2$ |
| Total | $y_1 + y_2$ | $m_1 + m_2 - y_1 - y_2$ | $m_1 + m_2$ |

### edgeR::binomTest

- Para el gen i-ésimo tendríamos los conteos $x_{i1}$ e $x_{i2}$ en las dos muestras siendo $m_1$ y $m_2$ los tamaños de las librerías.
- Suponemos fijo el número total de muestras para el gen i ($n_i = x_{i1} + x_{i2}$) y tamaño total de las dos librerías $m_1$ y $m_2$
- Bajo estas dos hipótesis previas vamos a contrastar que $H_i : p_1 = m_1/(m_1 + m_2)$ frente a $H_i : p_1 \neq m_1/(m_1 + m_2)$
- Como ilustración nos fijamos en las muestras 1 y 3.

```
pvalor13 = edgeR::binomTest(assay(PRJNA297664)[,1], assay(PRJNA297664)[,3])
```

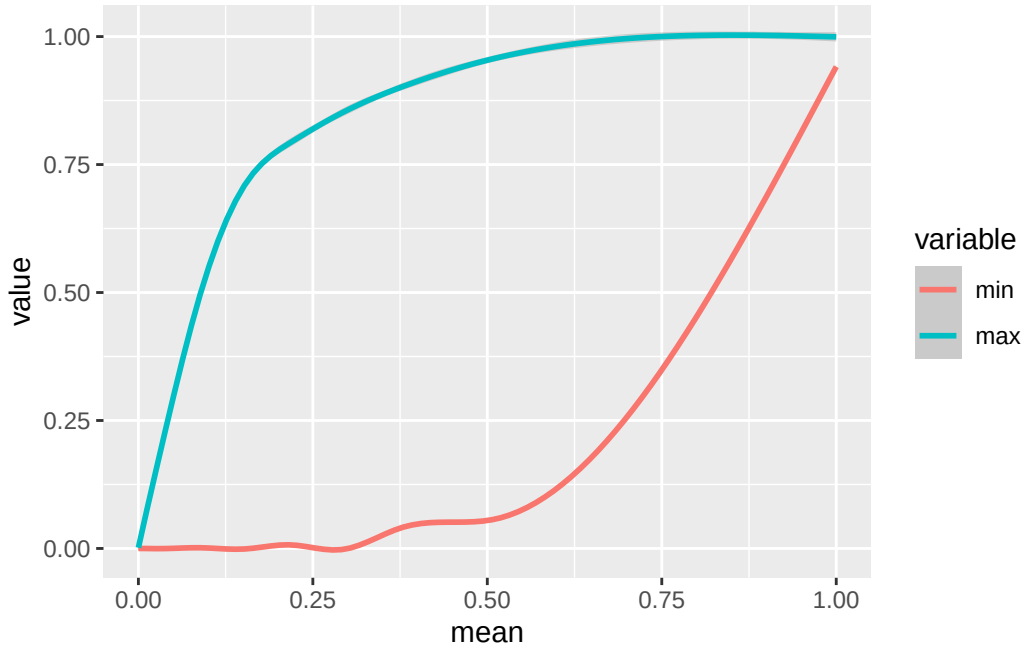
```
pacman::p_load(ggplot2)
df = data.frame(pvalor13)
ggplot2::ggplot(df,aes(x=pvalor13)) + geom_density()
```




```
pares = rbind(c(1,3),c(1,5),c(1,6),c(2,3),c(2,5),c(2,6),c(4,3),
    c(4,5),c(4,6))
pvalores = apply(pares,1,
                 function(x) binomTest(assay(PRJNA297664)[,x[1]],
                                       assay(PRJNA297664)[,x[2]]))
```

```r
y = apply(pvalores,1,function(x) c(mean(x),min(x),max(x)))
df = data.frame(t(y))
names(df) = c("mean","min","max")
df=df[sort(df[,"mean"],index.return=TRUE)$ix,]
df1 = reshape2::melt(df,id="mean")
pp = ggplot(df1,aes(x=mean,y=value,color=variable))
pp + geom_smooth()
```

```
`geom_smooth()` using method = 'gam' and formula = 'y ~ s(x, bs = "cs")'
```




## edgeR clásico

### Introducción

- Para dos grupos.
- Es un test exacto.
- Propuesto en Robinson and Smyth (2008) y Robinson and Smyth (2007) (en este orden).

## Estimación de una dispersión común

- Consideramos una característica (gen por ejemplo) en $n$ muestras (o librerías) de tamaños distintos.
- $m_i$, tamaño de la $i$-ésima librería (total de lecturas).
- $\lambda$, la proporción que hay en una librería cualquiera de la característica en que estamos interesados.
- Si $Y \sim NB(\mu, \phi)$ entonces la función de probabilidad viene dada por

$$f(y|\mu,\phi) = P(Y = y|\mu,\phi) = \frac{\Gamma(y+\phi^{-1})}{\Gamma(\phi^{-1})\Gamma(y+1)}\left(\frac{1}{1+\mu\phi}\right)^{\phi^{-1}}\left(\frac{\mu}{\phi^{-1}+\mu}\right)^{y}.$$

- Se tiene:
  - $E(Y) = \mu$,
  - $var(Y) = \mu + \phi\mu^2$.
- **Asumimos**: $Y_i \sim NB(m_i\lambda, \phi)$.

## Si las librerías tienen el mismo tamaño

- **Si** todas las librerías tienen el mismo tamaño: $m_i = m$ para $i = 1, \ldots, n$ entonces

$$Z = \sum_{i=1}^{n} Y_i \sim NB(nm\lambda, \phi/n).$$

- La **logverosimilitud condicionada** al valor $Z = z$ no depende de $\lambda$ y podemos estimar el valor de $\phi$.
- Se estimaría $\phi$ maximizando la logverosimilitud condicionada (a la suma de todos los conteos del gen) dada por

$$\ell_{\mathbf{y}|z} = \left[\sum_{i=1}^{n} \log\Gamma(y_i + 1/\phi)\right] + \log\Gamma(n/\phi) - \log\Gamma(z + n/\phi) - n\log\Gamma(1/\phi),$$

  donde $\mathbf{y} = (y_1, \ldots, y_n)'$ son los conteos observados.
- En el caso en que los tamaños de las librerías son distintos la verosimilitud no tiene una expresión simple.

- Modificamos los $y_i$ observados generando unos **pseudodatos** con el mismo tamaño de librería dado por

$$m^* = \left( \prod_{i=1}^{n} m_i \right)^{\frac{1}{n}}.$$

- ¿Y cómo transformamos los conteos $y_i$?

## qCML: Quantile-adjusted condicional maximum likelihood

1. Inicializamos $\phi$ (por ejemplo, con el estimador maxímo verosímil condicionado sin realizar ningún ajuste).
2. Dado el valor estimado de $\phi$, estimamos $\lambda$ maximizando la verosimilitud para el valor dado de la dispersión.
3. Suponemos que cada conteo $y_i$ es un valor observado de una distribución binomial negativa con media $m_i\lambda$ y parámetro de dispersión $\phi$. Calculamos los percentiles

$$p_i = P(Y < y_i | m_i\lambda, \phi) + \frac{1}{2} P(Y = y_i | m_i\lambda, \phi),$$

   para $i = 1, \ldots, n$.
4. Suponemos ahora una distribución binomial negativa con media $m^*\lambda$ y dispersion $\phi$.
    1. Determinamos qué valor sería el percentil de orden $p_i$ en la nueva distribución. Ya no tiene porqué ser un dato entero e incluso puede ser negativo.
    2. Los pseudodatos para un mismo gen tienen aproximadamente la misma distribución.
5. Estimamos la dispersión $\phi$ con los pseudodatos utilizando la veromilitud condicionada a la (pseudo) suma total de un gen.
6. Repetimos desde 2 hasta 5 hasta que converja $\phi$.

## Un test exacto para dos grupos

- $y_{ijk}$ el conteo para la **muestra** $k$ en la **condición** $j$ del gen $i$ donde $j = 1, 2$ y $k = 1, \ldots, n_j$.
- Los tamaños de la librería k de la condición j será $m_{jk}$.
- Los tamaños de las librerías **no** son iguales dentro de cada clase.

- Aplicamos el procedimiento qCML dentro de cada clase.

- Tenemos un tamaño común $m_j$ en la condición $j$.

- Estimamos $\phi$ maximizando

$$l(\phi) = \sum_{i=1}^{N} \ell_i(\phi).$$

con

$$\ell_i(\phi) = \sum_{j=1}^{2} \left( \sum_{k=1}^{n_j} \log\Gamma(y_{ijk} + \phi^{-1}) + \log\Gamma(n_j\phi^{-1}) - \log\Gamma(z_{ij} + n_j\phi^{-1}) - n_j \log\Gamma(\phi^{-1}) \right).$$

siendo $z_{ij} = y_{ij\cdot} = \sum_{k=1}^{n_j} y_{ijk}$.

- El estimador de $\phi$ será $\hat{\phi}_C$.

## Contraste de hipótesis

- Asumimos: $EY_{ijk} = m_{jk}\lambda_{ij}$.

- La hipótesis nula, **no hay diferencias entre las medias de los conteos en las dos condiciones para el $i$-ésimo gen** se formularía como

$H_i : \lambda_{i1} = \lambda_{i2}$, vs $K_i : \lambda_{i1} \neq \lambda_{i2}$.
- Bajo $H_i$, $\lambda_{i1} = \lambda_{i2} = \lambda_i$.
- Aplicamos **qCML** a **todas** las muestras: $y_{ijk}$ son los pseudodatos.
- Utilizando el estimador $\hat{\phi}_C$ y los conteos $y_{ijk}$ podemos estimar $\lambda_i$.
- Bajo la hipótesis nula de no diferencia entre grupos tendríamos que $Y_{ij\cdot} = \sum_{k=1}^{n_j} Y_{ijk} \sim NB(n_j m^* \hat{\lambda}_i, \hat{\phi}_C/n_j)$.

- $Y_{i1\cdot}$ e $Y_{i2\cdot}$ son independientes.
- La suma $Y_{i1\cdot} + Y_{i2\cdot}$ también tiene una distribución binomial negativa: $Y_{i1\cdot} + Y_{i2\cdot} = \sum_{i=1}^{2}\sum_{k=1}^{n_j} Y_{ijk} \sim NB((n_1+n_2)m^*\hat{\lambda}_i, \hat{\phi}_C/(n_1+n_2))$
- Podemos considerar la distribución condicionada del vector aleatorio $(Y_{i1\cdot}, Y_{i2\cdot})$ a la suma $Y_{i1\cdot} + Y_{i2\cdot}$ y considerar las probabilidades de los conteos conjuntos que **son menos probables que el observado**.
- La suma de estas probabilidades nos daría el p-valor del test.

### Dispersiones posiblemente distintas

- Una misma dispersión sobre una cantidad grande de genes no es muy razonable.
- Buena desde el punto de vista del modelo y su estimación pero nos aleja de los datos.
- Supongamos dispersiones posiblemente distintas para los distintos genes, $\phi_i$.
- Proponen
$$WL(\phi_i) = \ell_i(\phi_i) + \alpha\ell(\phi_i)$$
siendo $\alpha$ el peso que se da a la verosimilitud global.
- Es una función que propone un compromiso entre considerar $l$ como función a maximizar considerando la misma contribución a todos los genes y $l_i$ en donde solamente consideramos los conteos del propio gen.
- En Robinson and Smyth (2008) proponen un método de estimación de $\alpha$.

## Un análisis con edgeR

### DGEList

- Tenemos un `SummarizedExperiment`.
- Construimos un `DGEList`.

```
x = DGEList(counts = assay(PRJNA297664),
            group = colData(PRJNA297664)[,"treatment"])
```

- La clase del nuevo objeto es

```
class(x)
```

```
[1] "DGEList"
attr(,"package")
[1] "edgeR"
```

Y sus atributos son

```
attributes(x)
```

```
$class
[1] "DGEList"
attr(,"package")
[1] "edgeR"

$names
[1] "counts"  "samples"
```

La matriz de conteos

```
x$counts
```

Tenemos la componente `samples`.

```
class(x$samples)
```

```
[1] "data.frame"
```

Las primeras filas son

```
head(x$samples)
```

```
                group lib.size norm.factors
Sample1           Wild  4788536            1
Sample2           Wild  9387986            1
Sample3 SEC66 deletion  9599910            1
Sample4           Wild  8896028            1
Sample5 SEC66 deletion  9003755            1
Sample6 SEC66 deletion  9002105            1
```

Tenemos un `factor`.

```
x$samples[,"group"]
```

```
[1] Wild           Wild           SEC66 deletion Wild           SEC66 deletion
[6] SEC66 deletion
Levels: Wild SEC66 deletion
```

Los tamaños de las librerías son

```
x$samples[,"lib.size"]
```

```
[1] 4788536 9387986 9599910 8896028 9003755 9002105
```

Los factores de normalización son

```
x$samples[,"norm.factors"]
```

```
[1] 1 1 1 1 1 1
```

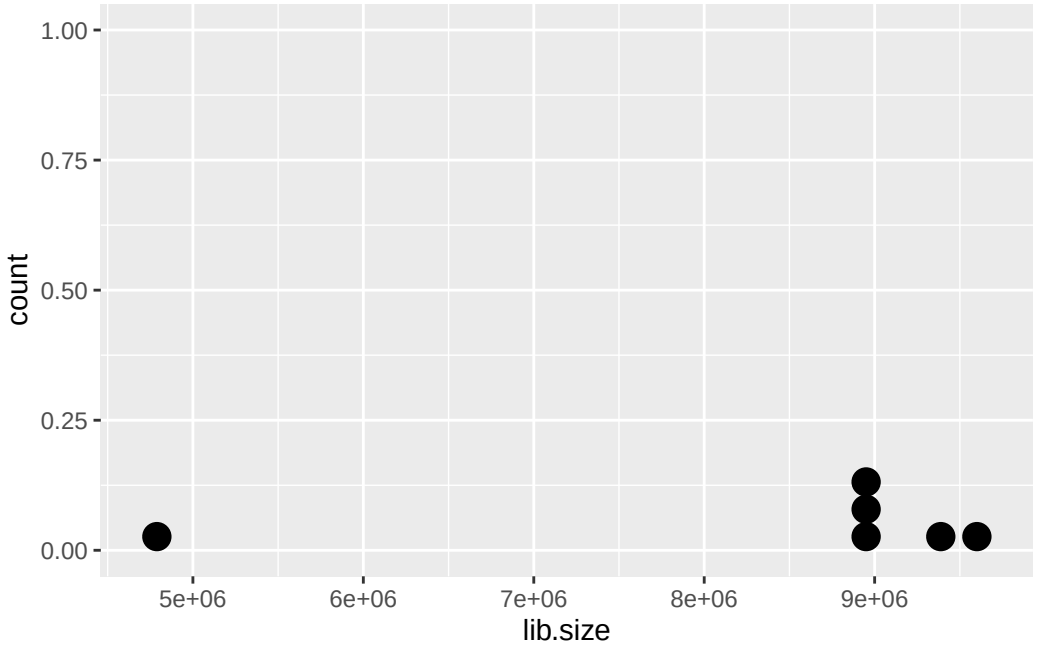
Veamos una descripción de los tamaños de las librerías.

```
summary(x$samples[,"lib.size"])
```

```
   Min. 1st Qu.  Median    Mean 3rd Qu.    Max. 
4788536 8922547 9002930 8446387 9291928 9599910 
```

```
ggplot(x$samples,aes(x= lib.size)) + geom_dotplot()
```

```
Bin width defaults to 1/30 of the range of the data. Pick better value with
`binwidth`.
```



### Eliminando genes con conteos bajos

Utilizamos los conteos por millón CPM en lugar de los conteos originales. Obligamos a que se recalculen los tamaños de las librerías.

```
 keep = rowSums(cpm(x)>1) >= 2
 x <- x[keep, , keep.lib.sizes=FALSE]
```

```
dge = DGEList(counts=assay(PRJNA297664),
              group=colData(PRJNA297664)[,"treatment"])
dge.c = estimateCommonDisp(dge) ##Estimamos dispersión común
dge.c$common.dispersion
```

```
[1] 0.01170892
```

```
dge.t =  estimateTagwiseDisp(dge.c) ##Dispersiones por gen
et.c = exactTest(dge.c)
et.t = exactTest(dge.t)
```

Y vemos los resultados.

```
topTags(et.c)
```

```
Comparison of groups:  SEC66 deletion-Wild
               logFC   logCPM        PValue           FDR
YBR171W   -10.150220 6.114922 2.128720e-258 1.516926e-254
YCR021C    -1.928779 8.463733  4.873506e-47  1.736430e-43
YBR054W    -1.878579 7.156683  3.518798e-43  8.358318e-40
YGL255W    -1.846348 7.518466  1.930760e-42  3.439650e-39
YNR034W-A  -2.176676 4.670571  1.175800e-40  1.675749e-37
YBR093C    -1.694281 8.563323  2.731791e-37  3.244457e-34
YFR053C     1.621598 6.384697  2.625927e-31  2.673194e-28
YER150W    -1.560027 5.479642  2.325258e-26  2.071224e-23
YDR171W    -1.383170 7.792428  2.142035e-25  1.696015e-22
YDR214W     1.362108 7.982939  1.024220e-24  7.298589e-22
```

```
topTags(et.t)
```

```
Comparison of groups:  SEC66 deletion-Wild
               logFC    logCPM        PValue           FDR
YBR171W   -10.150503  6.114922 5.636513e-296 4.016579e-292
YGL255W    -1.846051  7.518466  5.459134e-30  1.945090e-26
YBR093C    -1.694086  8.563323  5.843701e-27  1.388074e-23
YNR034W-A  -2.174452  4.670571  7.411466e-22  1.320353e-18
YDR214W     1.362104  7.982939  2.334672e-20  3.327375e-17
YLR109W     1.240894  9.510958  4.583075e-20  5.443166e-17
YHR215W    -1.208860  9.533270  2.172522e-18  2.211627e-15
YAR071W    -1.211709  9.219219  3.764430e-18  3.353166e-15
YMR186W     1.109256 11.622933  9.483967e-18  7.509195e-15
YKL161C     1.100257  5.723199  1.070358e-16  7.627369e-14
```

## edgeR utilizando modelo lineal generalizado

### Modelo

- $Y_{ij}$ el conteo aleatorio (número de lecturas alineadas) para el gen $i$ en la muestra $j$.
- Denotamos por $m_j = \sum_{i=1}^{N} y_{.j}$ la profundidad de secuenciación o total de lecturas de la muestra $j$.
- Utilizamos como función de enlace el logarítmo natural.
- Consideramos la profundidad de secuenciación como offset (un modelo de tasas sobre la profundidad de secuenciación).
- El modelo para la media es
$$\ln \mu_{ij} = \mathbf{x}_j^T{}_i + \ln m_j.$$
- En el modelo las variables predictoras son comunes a todos los genes.
- Asumimos que la componente aleatoria sigue una distribución binomial negativa (con el parámetro de dispersión conocido).
- Entonces
$$var(Y_{ij}) = \mu_{ij} + \phi_i \mu_{ij}^2,$$
siendo $\phi_i$ el parámetro de dispersión que hemos de asumir conocido o, de otro modo, tenemos que estimarlo previamente.

- En McCarthy, Chen, and Smyth (2012) muestran cómo estimar por máxima verosimitud el vector de coeficientes ${}_i$.
- Utilizan una modificación de los mínimos cuadrados iterativamente reponderados (IRWLS).

- El parámetro de dispersión se estima maximizando la logverosimilitud penalizada definida como

$$APL_i(\phi_i) = \ell(\phi_i; \mathbf{y}_i, \hat{}_i) - \frac{1}{2} \ln |\mathbb{I}_i|$$

siendo:

  - $\mathbf{y}_i$ los conteos para el gen $i$,
  - $\hat{}_i$ el vector de coeficientes,
  - $\ell()$ es la función de logverosimilitud
  - $|\mathbb{I}_i|$ el determinante de la matriz de información de Fisher para el $i$-ésimo gen.

## TCGA-COAD

```
pacman::p_load(edgeR,SummarizedExperiment)
load(paste0(dirTamiData,"tcga_coad.rda"))
```

- Nos centramos en las variables fenotípicas `age_at_diagnosis` y `tissue_or_organ_of_origin`.

```
colData(tcga_coad)
```

```
DataFrame with 328 rows and 30 columns
                            shortLetterCode          definition sample_type_id
                                   <factor>            <factor>       <factor>
TCGA-AM-5820-01A-01R-1653-07             TP Primary solid Tumor             01
TCGA-D5-6920-01A-11R-1928-07             TP Primary solid Tumor             01
TCGA-DM-A1HB-01A-21R-A180-07             TP Primary solid Tumor             01
TCGA-AA-3518-11A-01R-1672-07             NT Solid Tissue Normal             11
TCGA-F4-6461-01A-11R-1774-07             TP Primary solid Tumor             01
...                                     ...                 ...            ...
TCGA-AA-3511-11A-01R-1839-07             NT Solid Tissue Normal             11
TCGA-AA-3713-11A-01R-1723-07             NT Solid Tissue Normal             11
TCGA-AA-A02K-01A-03R-A32Y-07             TP Primary solid Tumor             01
TCGA-CK-5913-01A-11R-1653-07             TP Primary solid Tumor             01
TCGA-A6-5657-01A-01R-A32Z-07             TP Primary solid Tumor             01
                                  sample_type days_to_diagnosis
                                     <factor>         <numeric>
TCGA-AM-5820-01A-01R-1653-07 Primary Tumor                    0
TCGA-D5-6920-01A-11R-1928-07 Primary Tumor                    0
TCGA-DM-A1HB-01A-21R-A180-07 Primary Tumor                    0
TCGA-AA-3518-11A-01R-1672-07 Solid Tissue Normal              0
TCGA-F4-6461-01A-11R-1774-07 Primary Tumor                    0
```

```
...                                          ...                ...
TCGA-AA-3511-11A-01R-1839-07 Solid Tissue Normal                  0
TCGA-AA-3713-11A-01R-1723-07 Solid Tissue Normal                  0
TCGA-AA-A02K-01A-03R-A32Y-07 Primary Tumor                        0
TCGA-CK-5913-01A-11R-1653-07 Primary Tumor                        0
TCGA-A6-5657-01A-01R-A32Z-07 Primary Tumor                        0
                            tissue_or_organ_of_origin age_at_diagnosis
                                              <factor>        <numeric>
TCGA-AM-5820-01A-01R-1653-07          Colon, NOS                 21902
TCGA-D5-6920-01A-11R-1928-07          Sigmoid colon              28124
TCGA-DM-A1HB-01A-21R-A180-07          Transverse colon           27708
TCGA-AA-3518-11A-01R-1672-07          Cecum                      29769
TCGA-F4-6461-01A-11R-1774-07          Colon, NOS                 15151
...                                                  ...             ...
TCGA-AA-3511-11A-01R-1839-07           Colon, NOS                23407
TCGA-AA-3713-11A-01R-1723-07           Colon, NOS                24927
TCGA-AA-A02K-01A-03R-A32Y-07           Ascending colon           18506
TCGA-CK-5913-01A-11R-1653-07           Ascending colon           21399
TCGA-A6-5657-01A-01R-A32Z-07           Colon, NOS                23920
                                  primary_diagnosis prior_malignancy
                                           <factor>         <factor>
TCGA-AM-5820-01A-01R-1653-07 Adenocarcinoma, NOS                   no
TCGA-D5-6920-01A-11R-1928-07 Adenocarcinoma, NOS                   no
TCGA-DM-A1HB-01A-21R-A180-07 Mucinous adenocarcinoma               no
TCGA-AA-3518-11A-01R-1672-07 Adenocarcinoma, NOS                   no
TCGA-F4-6461-01A-11R-1774-07 Adenocarcinoma, NOS                   no
...                                                  ...             ...
TCGA-AA-3511-11A-01R-1839-07     Adenocarcinoma, NOS              no
TCGA-AA-3713-11A-01R-1723-07     Adenocarcinoma, NOS              yes
TCGA-AA-A02K-01A-03R-A32Y-07     Adenocarcinoma, NOS              no
TCGA-CK-5913-01A-11R-1653-07     Adenocarcinoma, NOS              no
TCGA-A6-5657-01A-01R-A32Z-07     Adenocarcinoma, NOS              no
                            year_of_diagnosis prior_treatment
                                    <numeric>        <factor>
TCGA-AM-5820-01A-01R-1653-07             2010              No
TCGA-D5-6920-01A-11R-1928-07             2011              No
TCGA-DM-A1HB-01A-21R-A180-07             2000              No
TCGA-AA-3518-11A-01R-1672-07             2007              No
TCGA-F4-6461-01A-11R-1774-07             2011              No
...                                       ...             ...
TCGA-AA-3511-11A-01R-1839-07             2005              No
TCGA-AA-3713-11A-01R-1723-07             2005              No
TCGA-AA-A02K-01A-03R-A32Y-07             2009              No
```

```
TCGA-CK-5913-01A-11R-1653-07             2008             No
TCGA-A6-5657-01A-01R-A32Z-07             2010             No
                           ajcc_pathologic_t morphology ajcc_pathologic_n
                                    <factor>   <factor>          <factor>
TCGA-AM-5820-01A-01R-1653-07              T4a     8140/3                N2
TCGA-D5-6920-01A-11R-1928-07              T3      8140/3                N0
TCGA-DM-A1HB-01A-21R-A180-07              T3      8480/3                N1
TCGA-AA-3518-11A-01R-1672-07              T3      8140/3                N0
TCGA-F4-6461-01A-11R-1774-07              T4b     8140/3                N2
...                                       ...        ...               ...
TCGA-AA-3511-11A-01R-1839-07               T4     8140/3                N0
TCGA-AA-3713-11A-01R-1723-07               T3     8140/3                N0
TCGA-AA-A02K-01A-03R-A32Y-07               T4     8140/3                N2
TCGA-CK-5913-01A-11R-1653-07               T3     8140/3                N0
TCGA-A6-5657-01A-01R-A32Z-07               T3     8140/3                N1
                           ajcc_pathologic_m icd_10_code
                                    <factor>    <factor>
TCGA-AM-5820-01A-01R-1653-07               M1       C18.9
TCGA-D5-6920-01A-11R-1928-07               M0       C18.7
TCGA-DM-A1HB-01A-21R-A180-07               M0       C18.4
TCGA-AA-3518-11A-01R-1672-07               M0       C18.0
TCGA-F4-6461-01A-11R-1774-07               M0       C18.9
...                                       ...         ...
TCGA-AA-3511-11A-01R-1839-07               M0       C18.9
TCGA-AA-3713-11A-01R-1723-07               M1       C18.9
TCGA-AA-A02K-01A-03R-A32Y-07               M1       C18.2
TCGA-CK-5913-01A-11R-1653-07               MX       C18.2
TCGA-A6-5657-01A-01R-A32Z-07               M0       C18.9
                           site_of_resection_or_biopsy
                                             <factor>
TCGA-AM-5820-01A-01R-1653-07           Colon, NOS
TCGA-D5-6920-01A-11R-1928-07           Sigmoid colon
TCGA-DM-A1HB-01A-21R-A180-07           Transverse colon
TCGA-AA-3518-11A-01R-1672-07           Cecum
TCGA-F4-6461-01A-11R-1774-07           Colon, NOS
...                                              ...
TCGA-AA-3511-11A-01R-1839-07            Colon, NOS
TCGA-AA-3713-11A-01R-1723-07            Colon, NOS
TCGA-AA-A02K-01A-03R-A32Y-07            Ascending colon
TCGA-CK-5913-01A-11R-1653-07            Ascending colon
TCGA-A6-5657-01A-01R-A32Z-07            Colon, NOS
                           progression_or_recurrence
                                           <factor>
```

```
TCGA-AM-5820-01A-01R-1653-07              not reported
TCGA-D5-6920-01A-11R-1928-07              not reported
TCGA-DM-A1HB-01A-21R-A180-07              not reported
TCGA-AA-3518-11A-01R-1672-07              not reported
TCGA-F4-6461-01A-11R-1774-07              not reported
...                                              ...
TCGA-AA-3511-11A-01R-1839-07              not reported
TCGA-AA-3713-11A-01R-1723-07              not reported
TCGA-AA-A02K-01A-03R-A32Y-07              not reported
TCGA-CK-5913-01A-11R-1653-07              not reported
TCGA-A6-5657-01A-01R-A32Z-07              not reported
                                                 race   gender
                                             <factor> <factor>
TCGA-AM-5820-01A-01R-1653-07              white          female
TCGA-D5-6920-01A-11R-1928-07              white          female
TCGA-DM-A1HB-01A-21R-A180-07              white          male
TCGA-AA-3518-11A-01R-1672-07              not reported   female
TCGA-F4-6461-01A-11R-1774-07              white          female
...                                                 ...      ...
TCGA-AA-3511-11A-01R-1839-07 not reported                  male
TCGA-AA-3713-11A-01R-1723-07 not reported                  male
TCGA-AA-A02K-01A-03R-A32Y-07 not reported                  male
TCGA-CK-5913-01A-11R-1653-07 white                         female
TCGA-A6-5657-01A-01R-A32Z-07 black or african american     male
                                          ethnicity vital_status age_at_index
                                           <factor>     <factor>    <numeric>
TCGA-AM-5820-01A-01R-1653-07 not hispanic or latino        Alive           59
TCGA-D5-6920-01A-11R-1928-07 not hispanic or latino        Alive           77
TCGA-DM-A1HB-01A-21R-A180-07 not hispanic or latino        Alive           75
TCGA-AA-3518-11A-01R-1672-07 not reported                  Alive           81
TCGA-F4-6461-01A-11R-1774-07 not hispanic or latino        Dead            41
...                                             ...          ...          ...
TCGA-AA-3511-11A-01R-1839-07 not reported                  Alive           64
TCGA-AA-3713-11A-01R-1723-07 not reported                  Alive           68
TCGA-AA-A02K-01A-03R-A32Y-07 not reported                  Dead            50
TCGA-CK-5913-01A-11R-1653-07 not hispanic or latino        Alive           58
TCGA-A6-5657-01A-01R-A32Z-07 not hispanic or latino        Alive           65
                            days_to_birth year_of_birth
                                <numeric>     <numeric>
TCGA-AM-5820-01A-01R-1653-07       -21902          1951
TCGA-D5-6920-01A-11R-1928-07       -28124          1934
TCGA-DM-A1HB-01A-21R-A180-07       -27708          1925
TCGA-AA-3518-11A-01R-1672-07       -29769          1926
```

```
TCGA-F4-6461-01A-11R-1774-07        -15151          1970
...                                    ...           ...
TCGA-AA-3511-11A-01R-1839-07        -23407          1941
TCGA-AA-3713-11A-01R-1723-07        -24927          1937
TCGA-AA-A02K-01A-03R-A32Y-07        -18506          1959
TCGA-CK-5913-01A-11R-1653-07        -21399          1950
TCGA-A6-5657-01A-01R-A32Z-07        -23920          1945
                                                    primary_site
                                                        <factor>
TCGA-AM-5820-01A-01R-1653-07 c("Colon", "Rectosigmoid junction")
TCGA-D5-6920-01A-11R-1928-07 c("Colon", "Rectosigmoid junction")
TCGA-DM-A1HB-01A-21R-A180-07 c("Colon", "Rectosigmoid junction")
TCGA-AA-3518-11A-01R-1672-07 c("Colon", "Rectosigmoid junction")
TCGA-F4-6461-01A-11R-1774-07 c("Colon", "Rectosigmoid junction")
...                                                          ...
TCGA-AA-3511-11A-01R-1839-07 c("Colon", "Rectosigmoid junction")
TCGA-AA-3713-11A-01R-1723-07 c("Colon", "Rectosigmoid junction")
TCGA-AA-A02K-01A-03R-A32Y-07 c("Colon", "Rectosigmoid junction")
TCGA-CK-5913-01A-11R-1653-07 c("Colon", "Rectosigmoid junction")
TCGA-A6-5657-01A-01R-A32Z-07 c("Colon", "Rectosigmoid junction")


TCGA-AM-5820-01A-01R-1653-07 c("Epithelial Neoplasms, NOS", "Cystic, Mucinous and Serous Neop
TCGA-D5-6920-01A-11R-1928-07 c("Epithelial Neoplasms, NOS", "Cystic, Mucinous and Serous Neop
TCGA-DM-A1HB-01A-21R-A180-07 c("Epithelial Neoplasms, NOS", "Cystic, Mucinous and Serous Neop
TCGA-AA-3518-11A-01R-1672-07 c("Epithelial Neoplasms, NOS", "Cystic, Mucinous and Serous Neop
TCGA-F4-6461-01A-11R-1774-07 c("Epithelial Neoplasms, NOS", "Cystic, Mucinous and Serous Neop
...
TCGA-AA-3511-11A-01R-1839-07 c("Epithelial Neoplasms, NOS", "Cystic, Mucinous and Serous Neop
TCGA-AA-3713-11A-01R-1723-07 c("Epithelial Neoplasms, NOS", "Cystic, Mucinous and Serous Neop
TCGA-AA-A02K-01A-03R-A32Y-07 c("Epithelial Neoplasms, NOS", "Cystic, Mucinous and Serous Neop
TCGA-CK-5913-01A-11R-1653-07 c("Epithelial Neoplasms, NOS", "Cystic, Mucinous and Serous Neop
TCGA-A6-5657-01A-01R-A32Z-07 c("Epithelial Neoplasms, NOS", "Cystic, Mucinous and Serous Neop
                                          name releasable released
                                      <factor>   <factor> <factor>
TCGA-AM-5820-01A-01R-1653-07 Colon Adenocarcinoma       TRUE     TRUE
TCGA-D5-6920-01A-11R-1928-07 Colon Adenocarcinoma       TRUE     TRUE
TCGA-DM-A1HB-01A-21R-A180-07 Colon Adenocarcinoma       TRUE     TRUE
TCGA-AA-3518-11A-01R-1672-07 Colon Adenocarcinoma       TRUE     TRUE
TCGA-F4-6461-01A-11R-1774-07 Colon Adenocarcinoma       TRUE     TRUE
...                                          ...         ...      ...
TCGA-AA-3511-11A-01R-1839-07 Colon Adenocarcinoma       TRUE     TRUE
TCGA-AA-3713-11A-01R-1723-07 Colon Adenocarcinoma       TRUE     TRUE
```

```
TCGA-AA-A02K-01A-03R-A32Y-07 Colon Adenocarcinoma       TRUE     TRUE
TCGA-CK-5913-01A-11R-1653-07 Colon Adenocarcinoma       TRUE     TRUE
TCGA-A6-5657-01A-01R-A32Z-07 Colon Adenocarcinoma       TRUE     TRUE
```

```
summary(colData(tcga_coad)[,"age_at_diagnosis"])
```

```
   Min. 1st Qu.  Median    Mean 3rd Qu.    Max.    NA's
  11391   20604   24896   24146   28204   32872       4
```

```
table(colData(tcga_coad)[,"tissue_or_organ_of_origin"])
```

```
         Ascending colon                     Cecum               Colon, NOS
                      72                        70                        59
      Descending colon Hepatic flexure of colon    Rectosigmoid junction
                      15                        12                         3
         Sigmoid colon Splenic flexure of colon         Transverse colon
                      76                         6                        13
```

- Hemos de eliminar aquellas muestras que tienen las variables predictoras con datos faltantes ya que las funciones que siguen no los admiten.

```
torm1 = which(is.na(colData(tcga_coad)$"age_at_diagnosis"))
torm2 = which(is.na(colData(tcga_coad)$ "tissue_or_organ_of_origin"))
toremove = union(torm1,torm2)
tcga_coad = tcga_coad[,-toremove]
```

- Construimos el objeto `DGEList` sin indicar ninguna variable `group` ni ninguna matriz de modelo y eliminamos genes con conteos bajos.

```
dge = DGEList(counts=assay(tcga_coad))
to_keep = rowSums(cpm(dge) > 0.5) > 20
dge =  dge[to_keep,keep.lib.sizes=FALSE]
dim(dge)
```

```
[1] 16155   324
```

- Construimos la matriz de modelo con las dos variables predictoras, una de caracter categórico y la otra numérica.
- Cambiamos los nombres de las columnas de la matriz de modelo.

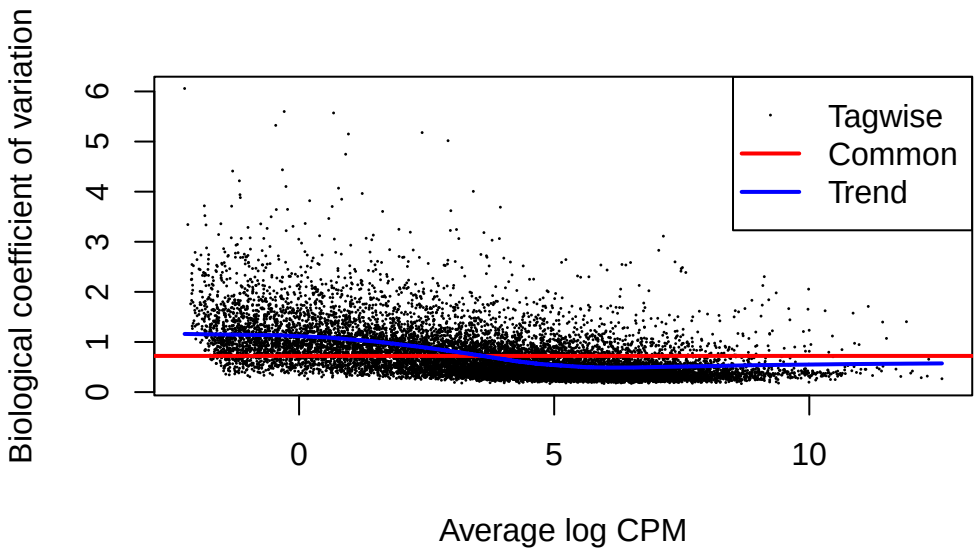
```
design0 = model.matrix(~  0 +
         colData(tcga_coad)$"tissue_or_organ_of_origin"
       + colData(tcga_coad)$"age_at_diagnosis")
y = levels(colData(tcga_coad)$"tissue_or_organ_of_origin")
y = sapply(y,function(x) gsub(" ","_",x)) ## Eliminamos espacios
y = sapply(y,function(x) gsub(",","_",x)) ## Eliminamos las comas
colnames(design0) = c(y,"age_at_diagnosis")
```

- Estimamos las dispersiones por tres métodos distintos:
  - Asumiendo una dispersión común,
  - una por gen y
  - con una relación media-varianza.

```
dge = estimateDisp(dge,design=design0)
```

Si solo queremos una de las tres opciones podemos usar las funciones `estimateGLMCommonDisp()`, `estimateGLMTagwiseDisp()` y `estimateGLMTrendedDisp()`.

```
plotBCV(dge)
```




```
fit = glmFit(dge, design=design0)
```

- Veamos si influye la variable `age_at_diagnosis`.

- Si observamos la matriz de modelo `design0` corresponde con la columna 10 de la matriz de modelo.
- Se realiza un test del cociente de verosimilitudes.

```
lrt1 = glmLRT(fit,coef="age_at_diagnosis")
lrt1 =  glmLRT(fit,coef=10) ## Equivalente a la línea anterior
topTags(lrt1)
```

```
Coefficient:  age_at_diagnosis
                logFC      logCPM       LR       PValue          FDR
UGT2B10 -0.0002335397  0.07018047 68.64932 1.176251e-16 1.753945e-12
KCNH3   -0.0001438677 -0.73269543 67.44089 2.170993e-16 1.753945e-12
CPS1    -0.0002306034  4.32352487 60.85641 6.139324e-15 3.306640e-11
SULT1E1 -0.0002374397  0.83203192 57.37333 3.604616e-14 1.456085e-10
GPR64   -0.0001654538  0.52261384 55.61329 8.822524e-14 2.851087e-10
UPK1A   -0.0002044708 -0.94768507 53.99073 2.014376e-13 5.424715e-10
KRT81   -0.0001417146 -0.31911518 50.55783 1.157049e-12 2.670799e-09
DLX5    -0.0001507914 -0.47209136 45.87384 1.261190e-11 2.547288e-08
EPHX3   -0.0001195753 -0.07584401 45.21348 1.766851e-11 2.897626e-08
CACNA1I -0.0001300370 -0.65221580 45.18437 1.793308e-11 2.897626e-08
```

- Podemos evaluar toda la variable `tissue_or_organ_of_origin`.

```
lrt2 = glmLRT(fit,coef=1:9)
topTags(lrt2)
```

```
Coefficient:  Ascending_colon Cecum Colon__NOS Descending_colon Hepatic_flexure_of_colon Rect
          logFC.Ascending_colon logFC.Cecum logFC.Colon__NOS
RBM44                  -23.03403   -22.79346        -23.20739
LPAL2                  -22.83425   -22.63042        -22.87998
C6orf52                -22.69677   -22.74012        -22.53655
SLC5A10                -22.59678   -22.67309        -22.35748
APOBEC3H               -22.53489   -22.57474        -22.19753
LINC00574              -22.53141   -22.30988        -21.93773
ATOH7                  -22.50255   -22.51006        -22.89692
GRAPL                  -22.47544   -21.90377        -21.80912
C6orf201               -22.45426   -22.61184        -22.56993
RPL23AP64              -22.43706   -22.48745        -22.71604
          logFC.Descending_colon logFC.Hepatic_flexure_of_colon
RBM44                  -22.81666                      -22.98087
LPAL2                  -22.60164                      -22.63563
```

```
C6orf52               -23.72080                     -22.34341
SLC5A10               -22.81269                     -22.55916
APOBEC3H              -22.89885                     -22.24700
LINC00574             -22.53327                     -21.59098
ATOH7                 -22.36426                     -21.88149
GRAPL                 -22.20629                     -22.98721
C6orf201              -22.39796                     -22.18401
RPL23AP64             -22.31727                     -22.72084
          logFC.Rectosigmoid_junction logFC.Sigmoid_colon
RBM44                       -23.39152          -22.83901
LPAL2                       -23.04283          -22.15825
C6orf52                     -22.72652          -22.77770
SLC5A10                     -22.73793          -22.61990
APOBEC3H                    -23.32153          -22.97932
LINC00574                   -22.95598          -22.59596
ATOH7                       -22.15867          -21.84132
GRAPL                       -23.39572          -22.33813
C6orf201                    -23.12831          -22.58081
RPL23AP64                   -22.02019          -22.25008
          logFC.Splenic_flexure_of_colon logFC.Transverse_colon    logCPM
RBM44                          -23.79191             -19.16905 -1.002324
LPAL2                          -21.86348             -22.40498 -1.565987
C6orf52                        -23.11693             -22.67335 -1.343997
SLC5A10                        -22.40977             -22.32619 -1.460341
APOBEC3H                       -23.29649             -22.81347 -1.370931
LINC00574                      -22.88247             -22.21847 -1.774904
ATOH7                          -23.02326             -22.96452 -1.657356
GRAPL                          -22.30881             -21.52397 -1.620106
C6orf201                       -22.25201             -21.85007 -1.707904
RPL23AP64                      -22.98331             -21.64723 -1.707398
                LR PValue FDR
RBM44     3115.908      0   0
LPAL2     1931.307      0   0
C6orf52   1762.968      0   0
SLC5A10   4317.670      0   0
APOBEC3H  1790.031      0   0
LINC00574 1759.550      0   0
ATOH7     2369.495      0   0
GRAPL     1708.911      0   0
C6orf201  2875.556      0   0
RPL23AP64 2940.747      0   0
```

- Y elegir los contraste que queramos.

- Mostramos una comparación entre dos grupos.

```
AD = makeContrasts(contrast1 = Ascending_colon - Descending_colon,
                   levels=design0)
lrt3 = glmLRT(fit,contrast = AD)
topTags(lrt3)
```

```
Coefficient:  1*Ascending_colon -1*Descending_colon
           logFC     logCPM       LR       PValue          FDR
ACTL8  -3.626585  1.9449815 41.05906 1.476981e-10 1.765755e-06
DBH    -2.980882 -0.6717054 40.29327 2.185611e-10 1.765755e-06
IGFN1  -3.772058  0.1735114 38.82410 4.637663e-10 2.497845e-06
PCCA   -1.854167  6.0403726 37.84606 7.655289e-10 3.092354e-06
INHA   -3.544573 -1.2757898 34.69282 3.860522e-09 1.247566e-05
FLT3   -2.515272 -0.6541790 34.27551 4.783649e-09 1.288237e-05
MUM1L1 -2.947467 -0.5294079 29.86079 4.642074e-08 1.071523e-04
MYO3B  -2.250829 -1.0459367 28.57745 9.002435e-08 1.818267e-04
KRT14   8.581216  2.8419848 26.64655 2.442861e-07 4.385750e-04
PPP4R4 -2.363616 -1.4762586 24.69543 6.714311e-07 1.084898e-03
```

## Bibliografía


McCarthy, Davis J., Yunshun Chen, and Gordon K. Smyth. 2012. "Differential Expression Analysis of Multifactor RNA-Seq Experiments with Respect to Biological Variation." *Nucleic Acids Research* 40 (10): 4288–97. https://doi.org/10.1093/nar/gks042.

Robinson, Mark D., and Gordon K. Smyth. 2007. "Moderated Statistical Tests for Assessing Differences in Tag Abundance." *Bioinformatics* 23 (21): 2881–87. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm453.

———. 2008. "Small-Sample Estimation of Negative Binomial Dispersion, with Applications to SAGE Data." *Biostatistics* 9 (2): 321–32. https://doi.org/10.1093/biostatistics/kxm030.