



ALAG

ASOCIACIÓN
LATINOAMERICANA
DE GENÉTICA



SOCIEDAD
DE GENÉTICA
DE CHILE

Doctorado en
Biotecnología
PUCV - UTFSM

CURSO

Análisis de expresión diferencial de genes e investigación reproducibile con R

Dra. Débora Torrealba Sandoval



Dra. Débora Torrealba – <https://genomics.pucv.cl>

Clase 8

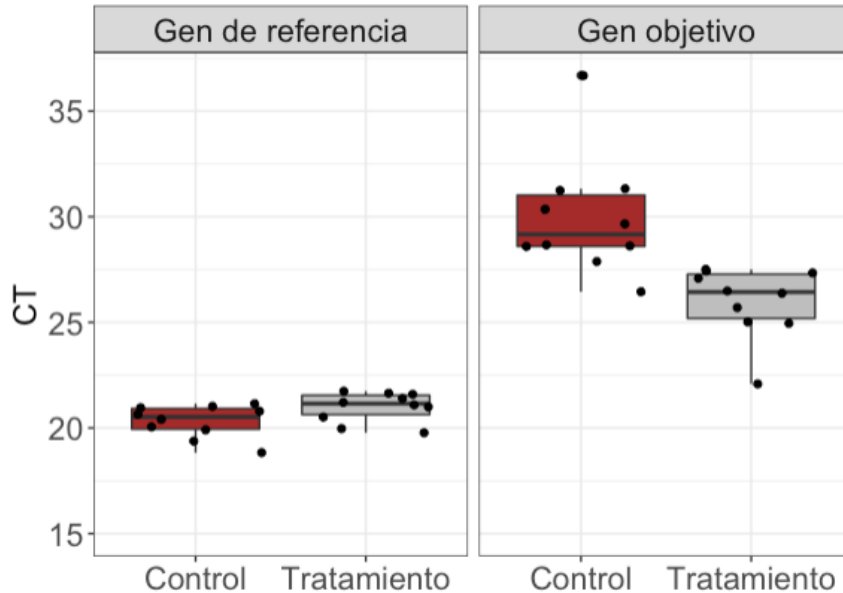
Cálculo de valores de expresión génica

Plan de la clase

- Introducción de los métodos de cálculo de la expresión génica
- Actividad práctica: Análisis de expresión génica en RStudio

Cuantificación relativa

Gen de interés es normalizado contra **gen de referencia**



Cálculo de valores de expresión génica

Existen 4 métodos principales para el calculo de la expresión génica:

- El método Delta-Delta Ct
- El método Delta Ct
- El método Pfaffl
- El método Vandesompele

Método $\Delta\Delta C_T$ o Livak

Requisitos:

- Muestras control
- Muestras de tratamiento
- Genes de interés y eficiencia de los cebadores
- Gen de referencia y eficiencia de los cebadores

Supuestos:

- Eficiencia de los cebadores del gen de interés y de referencia es cercano al 100% y con una diferencia del 10% entre sí.

Se normaliza la expresión génica a las muestras control y el gen de referencia

Método $\Delta\Delta C_T$

METHODS 25, 402–408 (2001)

doi:10.1006/meth.2001.1262, available online at <http://www.idealibrary.com> on **IDEAL**®

Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method

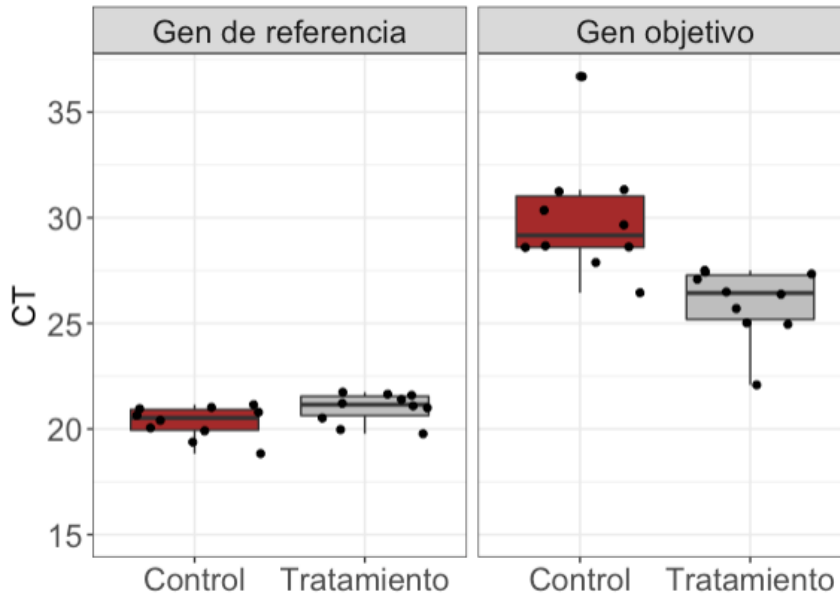
Kenneth J. Livak* and Thomas D. Schmittgen†,1

**Applied Biosystems, Foster City, California 94404; and †Department of Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, Washington State University, Pullman, Washington 99164-6534*

Método $\Delta\Delta C_T$

$$\Delta C_T(\text{Control}) = C_T(\text{GI}) - C_T(\text{GR})$$

$$\Delta C_T(\text{Tratamiento}) = C_T(\text{GI}) - C_T(\text{GR})$$



GI: gen de interés
GR: gen de referencia

Método $\Delta\Delta C_T$

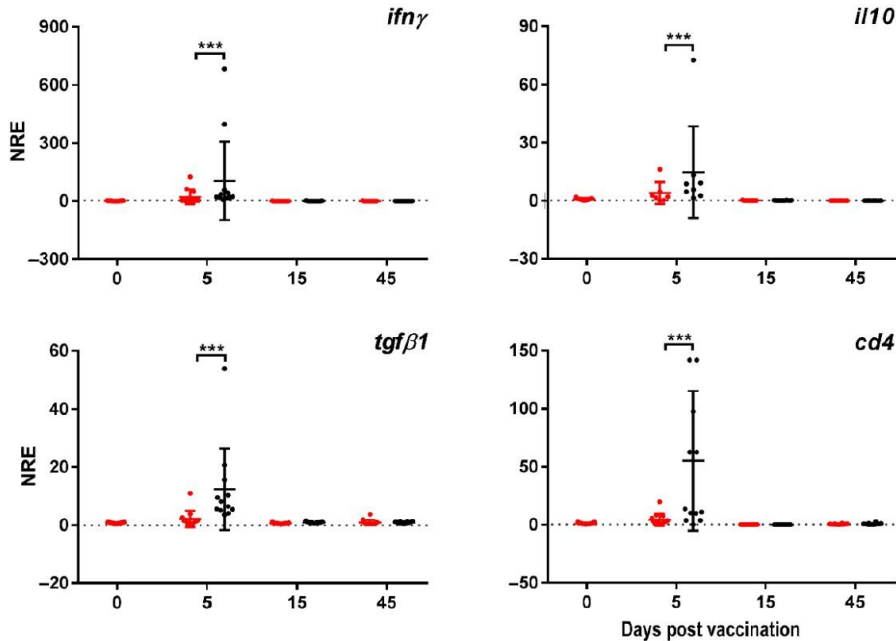
$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T(\text{Tratamiento}) - \Delta C_T(\text{Control})$$

$$2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Resultado:

Expresión génica normalizada en relación con el gen de referencia y las muestras control

Método $\Delta\Delta C_T$



NRE: Normalized relative expression

Salmón del Atlántico



Vargas et al. 2021.
Microorganisms

Gen de referencia: *ef1a*

Método ΔC_T

Requisitos:

- Muestras control
- Muestras de tratamiento
- Genes de interés
- Variación del método Livak.
- Este método utiliza la diferencia entre los valores de CT de referencia y objetivo para cada muestra.

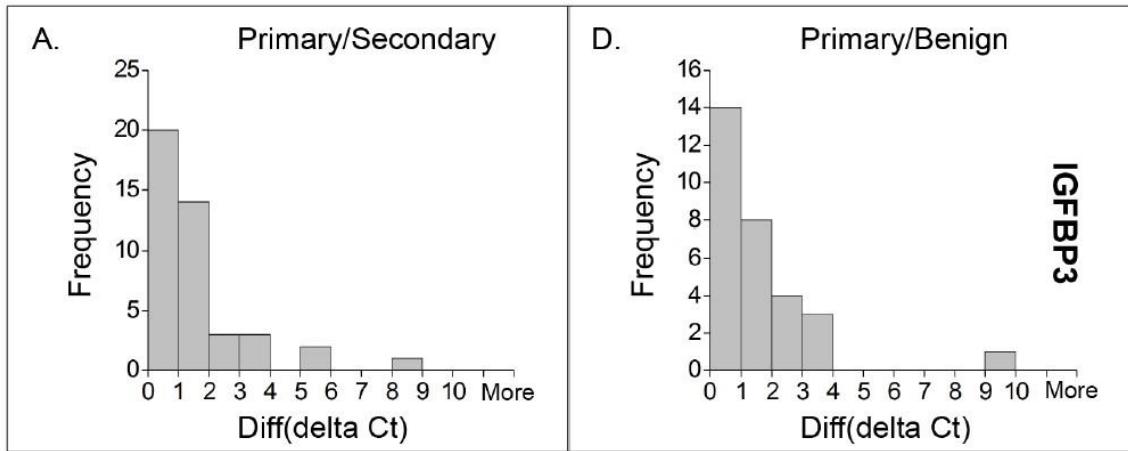
Método ΔC_T

$$2^{\Delta C_t (\text{control}) - (\text{tratamiento})}$$

Resultado:

No está normalizado. Expresión génica relativa a un calibrador

Método ΔC_T



Próstata

Peng et al. 2014. PlosOne



Para dos muestras de tumor diferentes
obtenidas del mismo paciente.

Método Pfaffl

- **Requisitos:**

- Muestras control y tratamiento
- Genes de interés y eficiencia de los cebadores
- Gen de referencia y eficiencia de los cebadores

- **Supuestos:**

- Eficiencia de los cebadores del gen de interés y de referencia es cercano al 100% y con una diferencia del 10% entre sí.
- Se normaliza la expresión génica a las muestras control y el gen de referencia
- Solo se puede usar un gen de referencia

Método Pfaffl

© 2001 Oxford University Press


Nucleic Acids Research, 2001, Vol. 29, No. 9 00

A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR

Michael W. Pfaffl*

Institute of Physiology, FML-Weihenstephan, Center of Life and Food Sciences, Technical University of Munich, Germany

**Factor de
amplificación**


$$\frac{(E_{GI})^{\Delta Ct_{GI}}}{(E_{GR})^{\Delta Ct_{GR}}}$$

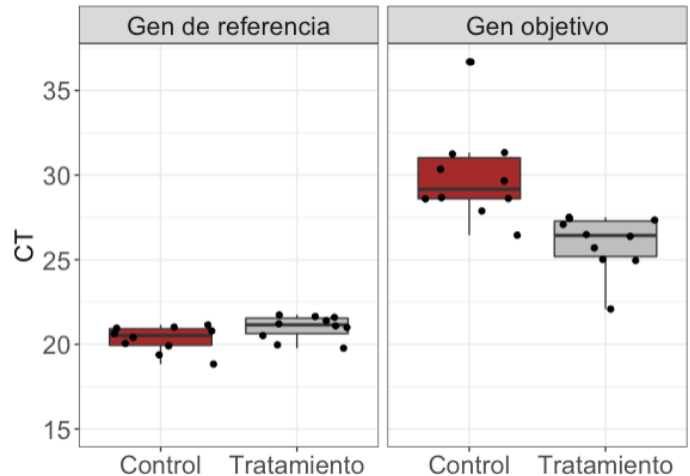
GI: gen de interés
GR: gen de referencia

Método Pfaffl

Ct individual- Ct promedio C

$$(E_{GI})^{\Delta Ct_{GI}}$$

$$(E_{GR})^{\Delta Ct_{GR}}$$



Resultado:

Expresión génica normalizada en relación con el gen de referencia y las muestras control

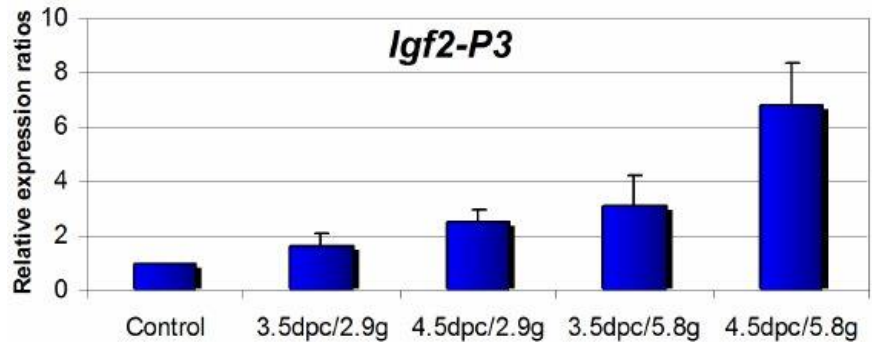
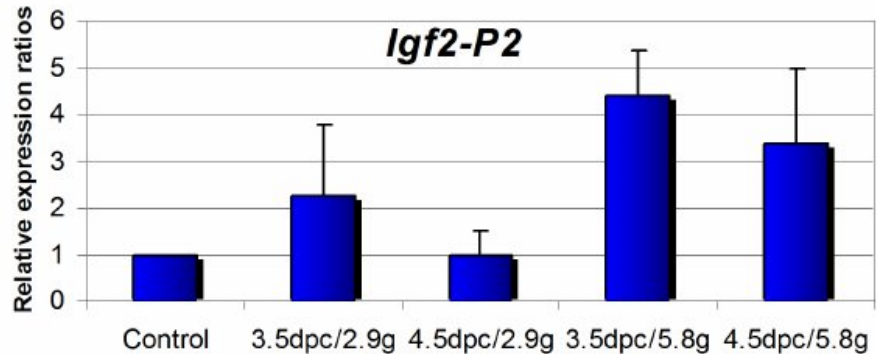


Embriones de
ratón

Gen de referencia:
hsp90ab1

Taseva et al. 2025.
Genetics and Plant
Physiology.

El método Pfaffl



Método Vandesompele

- **Requisitos:**

- Muestras control y tratamiento
- Genes de interés y eficiencia de los cebadores
- **Genes** de referencia y eficiencia de los cebadores

- **Supuestos:**

- Eficiencia de los cebadores del gen de interés y de referencia es cercano al 100% y con una diferencia del 10% entre sí.
- Se normaliza la expresión génica a las muestras control y a los genes de referencia
- Se pueden usar múltiples genes de referencia

Método Vandesompele

Research

Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes

Jo Vandesompele, Katleen De Preter, Filip Pattyn, Bruce Poppe, Nadine Van Roy, Anne De Paepe and Frank Speleman

Address: Center for Medical Genetics, Ghent University Hospital 1K5, De Pintelaan 185, B-9000 Ghent, Belgium.

Método Pfaffl

Método Vandesompele

$$(E_{GI})^{\Delta Ct_{GI}}$$

$$(E_{GR})^{\Delta Ct_{GR}}$$

Media
geométrica

$$(E_{GI})^{\Delta Ct_{GI}}$$

$$[(E_{GR})^{\Delta Ct_{GR}}]$$

Método Vandesompele

Media
geométrica

- Insensible a valores atípicos
- Puede manejar diferencias en los niveles de expresión entre diferentes genes de referencia

Media aritmética

$$\frac{a + b + c + d}{n}$$

$$\frac{a + b + c + d}{4}$$

Media geométrica

$$\sqrt[n]{a \times b \times c \times d}$$

$$\sqrt[4]{a \times b \times c \times d}$$

Método Vandesompele

$$\frac{(E_{GI})^{\Delta CtGI}}{\text{Media geométrica } [(E_{GR})^{\Delta CtGR}]}$$

Resultado:

Expresión génica multi-normalizada en relación con los genes de referencia y las muestras control

Actividad de aprendizaje

Cálculo de valores de expresión génica en R



Resumen de la clase

- Revisamos los métodos más comunes para el análisis de la expresión diferencial de genes como:
- Método Delta-Delta Ct
- Método Delta Ct
- Método Pfaffl
- Método Vandesompele
- A través de R analizamos un set de datos con el método Delta-Delta CT y Pfaffl.

Próxima clase

Clase 9: Inferencia estadística para el análisis de expresión de genes.

