



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA
CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



CENTRO DE INVESTIGACIÓN DEL CÁNCER

FACULTAD DE CIENCIAS

GRADO DE ESTADÍSTICA

Trabajo de fin de Grado: Anexos Teóricos.

**Flujos de trabajo sistemáticos para el diseño y análisis
computacional de microarrays de proteínas.**

Autora: Helena Fidalgo Gómez

Tutores: Dr. Manuel Fuentes García

Dr. José Manuel Sánchez Santos



CENTRO DE INVESTIGACIÓN
DEL CÁNCER

Salamanca, 2019

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN DEL
CÁNCER**

FACULTAD DE CIENCIAS

GRADO DE ESTADÍSTICA

Trabajo de fin de Grado: Anexos Teóricos.

**Flujos de trabajo sistemáticos para el diseño y análisis
computacional de microarrays de proteínas.**

Autora: Helena Fidalgo Gómez

Tutores: Dr. Manuel Fuentes García

José Manuel Sánchez Santos

Dr. Manuel Fuentes García

Dr. José Manuel Sánchez Santos

Helena Fidalgo Gómez

Salamanca, 2019

1. Introducción: capítulo desarrollado en el trabajo, página 3.

1.1. Introducción al Proteoma: capítulo desarrollado en el trabajo, página 3.

1.1.1. La Proteómica: capítulo desarrollado en el trabajo, página 5.

1.1.2. Métodos de análisis estadístico en Proteómica: capítulo desarrollado en el trabajo, página 7.

1.2. La tecnología del microarray: capítulo desarrollado en el trabajo, página 9.

1.2.1. Parámetros a tener en cuenta: capítulo desarrollado en el trabajo, página 10.

1.2.2. Tipos de microarray:

Gracias a la base de datos que se obtendrá y junto a diversos métodos bioinformáticos, se obtiene una matriz de datos final, que corresponde a los diferentes *spots* que forman el microarray.

Existe una gran variedad de microarrays de proteínas que se pueden clasificar en función de:

- A. Según el formato del microarray: arrays planos o de microesferas.
- B. Según el contenido del microarray: analíticas, funcionales o de fase inversa.
- C. Según su método de detección.

(Juanes-Velasco et al. 2018)

A. Microarrays según el formato:

Los microarrays de proteínas se pueden clasificar en dos grupos dependiendo de la estructura física del soporte:

- i. *Arrays planos:* en este tipo de array, el contenido es inmovilizado en microspots, dispuestos en una superficie de dos dimensiones, sobre una matriz sólida (Merbl & Kirschner, 2011), generalmente cada centímetro cuadrado de esta superficie sólida, está compuesto por 1000 spots. En estos arrays se busca principalmente la robustez y reproducibilidad del ensayo, lo cual está relacionado con una serie de parámetros que afectan al array como por ejemplo la superficie, el método de detección, el ruido de fondo (*background signal*), etc. (Ellington, Kullo, Bailey, & Klee, 2010).

Además, es necesario tener en cuenta la señal que proporciona el ruido de fondo ya que afecta a la señal propia de los *spots*. Esta señal inespecífica debe evaluarse y controlarse para detectar correctamente la señal de interacción entre el agente y la proteína.

Otro aspecto clave para estos arrays, es la adquisición de imágenes del array utilizando escáneres de fluorescencia, para analizar a continuación esta imagen con el software GenePix®, donde las intensidades de fluorescencia de cada microspot se calculan en función de su señal de píxeles, canales de emisión... Finalmente los datos de cada uno de los spots que componen el array, son exportados en forma de hoja de datos (García-Valiente et al., 2019).

- ii. *Arrays de microesferas*: en este tipo de formato, la ASR (*Analite Specific Reagents*) está unida, covalentemente, a microesferas direccionales. (Casado-Vela et al., 2013).

En este tipo de formato, existe, como mínimo, una esfera codificada por colores según el ligando y la muestra, y para poder distinguirlos, las esferas con diferentes proteínas o ligandos se marcan de forma sistemática, con diferentes fluorocromos (García-Valiente et al., 2019).

B. Microarrays según el contenido:

Según la naturaleza del agente capturador, existen diferentes tipos de microarrays de proteínas:

- *Microarrays analíticos o Microarrays de anticuerpos*: el modelo más representativo de microarrays de proteínas analíticas es el microarray de anticuerpos, en el que las proteínas se detectan después de la captura del anticuerpo mediante el marcado directo de las proteínas (Reymond Sutandy, Qian, Chen, & Zhu, 2013).
Estos pueden llegar a tener de cientos a miles de anticuerpos impresos, y generalmente su uso se basa en la identificación de biomarcadores en cáncer u otras patologías (Corrales et al., 2014).
- *Microarrays funcionales o Microarrays de proteínas recombinantes*: los microarrays de proteínas funcionales están surgiendo como una prometedora herramienta para estudios proteómicos de alto rendimiento, se caracterizan por la identificación de proteínas con diferentes moléculas (Reymond Sutandy et al., 2013).
Permiten la detección e identificación de modificaciones post-traduccionales (*PTMs*), como la fosforilación, la acetilación, ... que modulan la regulación, función y rotación de las proteínas (Figura G).
- *Microarrays de fase reversa o de lisados celulares*: gracias a este método se pueden analizar diversas muestras obtenidas en diferentes estados, para su

posterior detección de proteínas de interés, mediante anticuerpos específicos contra proteínas diana. Su objetivo principal es estudiar la presencia y los niveles de proteínas en lisados celulares.

Actualmente estos arrays se utilizan para la validación de biomarcadores, para realizar un seguimiento de determinadas proteínas durante la progresión de diferentes patologías o la identificación de moléculas diana de compuestos bioactivos con mecanismos de acción desconocidos (Corrales et al., 2014) (FiguraG).

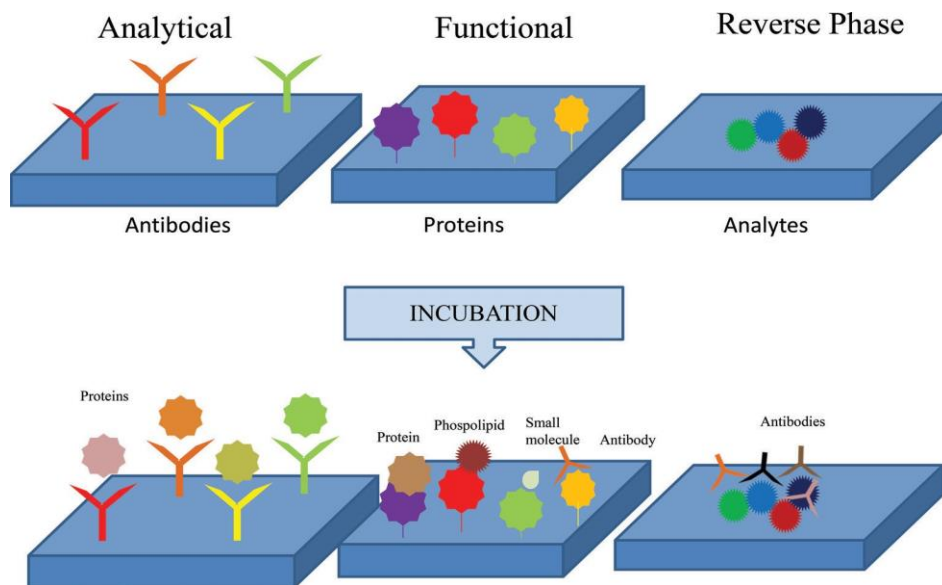


Figura G. Ejemplo de arrays según la naturaleza del agente de captura. Imagen adaptada de (Juanes-Velasco et al., 2018)

C. Microarrays según su método de detección:

Teniendo en cuenta el método de detección que se aplicará al array, se diferencia entre métodos con etiquetas (*label-dependent*) y sin etiquetas o con etiquetado libre (*label-free*) (González-González, Jara-Acevedo, Matarraz, Jara-Acevedo, & Paradinas, 2011).

I. Métodos basados en etiquetas (*label-dependent*):

- Etiquetas fluorescentes convencionales: un ejemplo son los radioisótopos y fluorocromos convencionales, estos son los más utilizados en arrays de proteínas debido a sus ventajas.
- Citometría de flujo en arrays de microesferas: proporciona un análisis cualitativo y cuantitativo que permite comprobar la fusión entre las proteínas diana y las microesferas. Se utiliza en arrays de microesferas.
- Esferas magnéticas: este método representa la unión de microesferas magnéticas con anticuerpos, permitiendo así la detección de proteínas.
- Puntos cuánticos como etiquetas de fluorescencia: estos puntos cuánticos son partículas nanométricas que funcionan como etiquetas, las cuales se asocian a péptidos o anticuerpos, con el fin de reconocer componentes celulares.

- Metal NPs como etiqueta: son nanopartículas de oro, que, gracias a sus ventajas como su eficiencia cuántica, compatibilidad de longitudes de onda y propiedades ópticas, son muy utilizados en la tecnología del microarray.
- Quantum Dots: son nano-cristales formados por un núcleo de material semiconductor y fluorescente, el cual está recubierto por otro semiconductor.

II. Métodos basados en etiquetado libre (*label-free*):

- Resonancia de plasmones superficiales (SPR): se generan plasmones sobre una superficie plana, estos se propagan de forma paralela entre el metal y el medio, gracias a la variación por la intensidad de la luz o el ángulo de incidencia, se puede analizar si existe, o no, algún tipo de interacción biomolecular.
- Microscopía de fuerza atómica (AFM): a través de un análisis microscópico se analizan las variaciones topológicas de la superficie de un objeto.
- Microcantilevers: son finas láminas de silicona cubiertas con una superficie de oro, las proteínas o anticuerpos se inmovilizan en determinadas láminas y a través de sistemas electrónicos se puede medir la interacción entre

1.2.3. Aplicaciones de los microarrays de proteínas: capítulo desarrollado en el trabajo, página 15.

2. Objetivos: capítulo desarrollado en el trabajo, página 15.

3. Materiales y métodos: capítulo desarrollado en el trabajo, página 16.

4. Conclusiones y perspectivas: capítulo desarrollado en el trabajo, página 47.

5. Bibliografía: capítulo desarrollado en el trabajo, página 51.