

Premios de investigación "Enrique Coris Gruart",  
Convocatoria 2014

**PERFILES DE TRANSCRIPCIÓN  
GÉNICA Y EXPRESIÓN PROTEICA  
EN OVINO NATURALMENTE  
INFECTADO POR SCRAPIE**

**Modalidad:** Medicina, Cirugía y Sanidad Animal Veterinarias, así como Ciencias Básicas relacionadas con las mismas

**Lema:** Biomarcadores asociados con scrapie



## RESUMEN

---

El scrapie es una enfermedad neuropatológica que forma parte del grupo de las encefalopatías espongiformes transmisibles (EETs). Los mecanismos específicos de la patogenia de estas enfermedades son poco conocidos. Los estudios transcriptómicos podrían aclarar los mecanismos patológicos moleculares y contribuir al desarrollo de nuevas herramientas para el diagnóstico y la terapia de las EETs.

En este trabajo se ha analizado la variabilidad del transcriptoma en ovejas naturalmente infectadas con scrapie en la fase clínica y preclínica de la enfermedad y en médula oblongada y linfonodos mesentéricos. Además, se ha analizado la expresión y distribución de las proteínas codificadas por seis genes seleccionados en el SNC.

En médula oblongada, hemos confirmado la alteración de la matriz extracelular y de las proteínas de unión a iones, así como la implicación del sistema inmune y de las proteasas lisosomales en la neuropatología del scrapie natural. En los linfonodos mesentéricos, la subexpresión de genes implicados en la reparación del mal plegamiento del prión, la regulación de genes implicados en la promoción de la angiogénesis y el déficit en la ceruloplasmina podrían contribuir a la formación de priones, a su difusión y a la toxicidad de los mismos, respectivamente. Por otro lado, la confirmación de las variaciones a nivel proteico de genes seleccionados, permite proponer a *CAPN6*, *GALAI*, *MTNR1B* y *MT2A* como posibles nuevos biomarcadores del scrapie.

Estos estudios pioneros en la expresión génica y distribución proteica de los productos de los genes alterados en scrapie natural han revelado nuevos potenciales biomarcadores de utilidad como diagnóstico o como dianas terapéuticas para las enfermedades priónicas.

## ABSTRACT

---

Scrapie is a neuropathological disease which belongs to the group of transmissible spongiform encephalopathies (TSEs). The specific mechanisms of the pathogenesis of these diseases are little known. Transcriptomic studies could clarify the pathological molecular mechanisms and allow the development of new tools for the diagnosis and therapy for TSEs.

In this work we analyzed the transcriptome variability in medulla oblongata and mesenteric lymph nodes of sheep naturally infected with scrapie during the clinical and preclinical stages of the disease. In addition, we studied the expression and distribution of six proteins, which are encoded by genes selected from the transcriptomic studies, in ovine CNS.

In medulla oblongata, we confirmed the alteration of genes coding for proteins involved in the extracellular matrix, ion-binding, immune system and lysosomal proteases. These genes could have a role in the neuropathology of natural scrapie. In the mesenteric lymph nodes, the downexpression of genes involved in prion misfolding repair, the regulation of genes involved in the promotion of angiogenesis and ceruloplasmin deficit could contribute respectively to prion formation, diffusion and toxicity. Furthermore, the confirmation of genetic changes at the protein level of selected genes, allows proposing *CAPN6*, *GALAI*, *MTNR1B* and *MT2A* as new potential biomarkers for ovine scrapie.

These pioneering studies of gene expression and protein distribution in natural scrapie have revealed new potential biomarkers for diagnosis of prion diseases and therapeutic targets for their treatment.

## I. INTRODUCCIÓN

Las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EETs) constituyen un grupo de enfermedades neurodegenerativas que afectan tanto a la especie humana como a los animales [1-3]. Las EETs que afectan a la especie humana incluyen el kuru, los diferentes tipos de la enfermedad de Creutzfeldt Jakob (ECJ), las diferentes formas del insomnio familiar fatal (IFF) y la enfermedad de Gerstman-Straüsler-Scheinken (GSS). Entre las enfermedades priónicas que afectan a los animales, destaca la Encefalopatía espongiforme bovina (EEB). Esta patología ha tenido gran impacto social en la Unión Europea por su trascendencia en la salud animal y sobre todo en la salud pública debido a su transmisión a la especie humana, dando origen a una nueva variante de la enfermedad de Creutzfeldt Jakob (vECJ), por lo que se le considera una zoonosis [4].

El scrapie ovino se considera la enfermedad prototipo de las EETs [5], fue la primera en descubrirse (1732) y ha sido la más estudiada de este grupo de trastornos nerviosos [6]. La lesión neurológica microscópica más característica de este grupo de enfermedades es la vacuolización del neuropilo de la sustancia gris (cambio espongiforme) y de los cuerpos neuronales [7]. Otras lesiones descritas son la degeneración y pérdida neuronal, gliosis reactiva, predominantemente astrocítica (astrocitosis), depósito de proteína amiloide y acumulación progresiva de la proteína PrP<sup>Sc</sup> [7-10]. El único agente etiológico asociado con las EETs es una proteína patológica (PrP<sup>Sc</sup>), denominada prion, que se forma mediante la conversión conformacional de una glicoproteína de la superficie celular (PrP<sup>C</sup>) [11]. La PrP<sup>C</sup> se expresa principalmente en las células del sistema nervioso central (SNC), y en menor medida en otras células de tejidos periféricos como las del sistema linforeticular (SLR) [12]. La vía de transmisión principal del scrapie y otras EETs como la EEB y la vECJ ha sido la infección del individuo por ingesta de alimentos contaminados con proteína

prionica por vía oral. Tras la toma de alimentos contaminados, la PrP<sup>Sc</sup> se transporta desde el intestino hasta el sistema nervioso central. Los datos actuales sugieren que la PrP<sup>Sc</sup> atraviesa el epitelio intestinal, posiblemente a través de las células M, y se acumula rápidamente en el tejido linfoide asociado al intestino (GALT), principalmente en la placa de Peyer de la mucosa intestinal, en los ganglios linfáticos mesentéricos y posteriormente en el bazo [13]. La linfoinvasión por el agente causal tras la ingestión del mismo constituye un hecho atractivo para la identificación de biomarcadores en la investigación de las enfermedades priónicas. Este proceso ocurre en la fase preclínica, antes de la neuroinvasión, por lo que se puede considerar un momento óptimo para el diagnóstico precoz o para una potencial intervención terapéutica [14]. Los linfonodos mesentéricos son uno de los primeros tejidos del SLR donde se acumula la PrP<sup>Sc</sup> durante la fase preclínica del scrapie natural [15, 16].

La proteína anormal PrP<sup>Sc</sup> es el único marcador de estas enfermedades y su presencia en los tejidos de los individuos afectados por una EET se ha utilizado como un indicador de la presencia y distribución de la infectividad [11]. El desenlace de las enfermedades priónicas es siempre fatal. Todavía son muchas las incógnitas con respecto a estas enfermedades, lo que dificulta la elaboración de nuevos tests que permitan el diagnóstico *in vivo*, así como la investigación de potenciales terapias. Las herramientas genómicas, incluyendo la transcriptómica masiva, podrían ayudar a la aclaración de los mecanismos moleculares de la patología de estas enfermedades, comparando el nivel transcripcional entre individuos sanos y enfermos. Asimismo, podrían permitir la identificación tanto de moléculas útiles para el diagnóstico como de dianas terapéuticas en las EETs y otras enfermedades neurodegenerativas. A lo largo de las dos últimas décadas se han realizado un gran número de análisis genómicos, principalmente en tejido nervioso, en modelos murinos adaptados a las enfermedades priónicas, incluyendo la ECJ, el scrapie y la EEB

[17-24]. Estos estudios han revelado alteraciones generalizadas de múltiples vías celulares que se correlacionan con la aparición de la patología asociada a la enfermedad, incluyendo la homeostasis del colesterol, la regulación de la apoptosis, la respuesta al estrés y la homeostasis de iones metálicos. Sin embargo, se han realizado muy pocos estudios sobre los cambios de los perfiles de expresión génica en tejidos del SNC o SLR procedentes de individuos afectados de forma natural por EETs, como el scrapie ovino [25], la EEB [26], la ECC [27] o la ECJ humana [28].

El trabajo presentado pretende determinar nuevos biomarcadores asociados a las EETs y analizar los mecanismos moleculares que conducen a la neuropatología asociada a estas enfermedades. Para ello, se ha analizado masivamente la variación de la transcripción génica en el ámbito natural del scrapie ovino en animales preclínicos en el SNC, y en animales clínicos y preclínicos en el SLR. Asimismo, se ha validado la expresión génica de algunos potenciales biomarcadores seleccionados entre los que mostraron cambios en SNC en fase clínica (estudio previo al trabajo presentado) analizando sus niveles proteicos.

## **II. METODOLOGÍA UTILIZADA**

### **II.1. Animales y obtención de muestras**

Para la realización de los análisis de expresión genómica mediante el uso de microarrays, se seleccionaron 6 ovejas sanas, 4 infectadas con scrapie en fase preclínica y 7 ovejas infectadas en fase terminal. Además, para llevar a cabo los trabajos de la expresión proteica, se analizaron 11 ovejas adicionales (5 controles, una preclínica y 5 clínicas). Los 28 animales pertenecían a la raza Rasa Aragonesa siendo todas ellas hembras y del mismo genotipo para el gen *PRNP* (ARQ/ARQ) y con una edad comprendida entre 1 y 10 años. Los sueros de las ovejas eran negativos a la detección del virus Maedi-Visna. Los animales positivos formaban parte de un rebaño conservado para trabajos de investigación por el Centro de Investigación en Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes, de

la Universidad de Zaragoza, en el que han aparecido varios casos de scrapie en los últimos años y en el que se introducen continuamente animales positivos procedentes del Programa de Vigilancia de Scrapie. Las ovejas control procedían de distintos rebaños donde no se ha descrito ningún caso de scrapie hasta la fecha. En los animales afectados, la enfermedad priónica se confirmó mediante un test rápido [29]. Se emplearon también técnicas inmunohistoquímicas con el anticuerpo monoclonal anti-PrP L42 para la detección de depósitos de PrP<sup>Sc</sup> tanto en el SNC como en el SLR.

Todos los animales se sacrificaron mediante inyección intravenosa de pentobarbital sódico y posteriormente se realizó la necropsia para la toma de diferentes muestras. En este trabajo se han utilizado 6 muestras distintas: linfonodos mesentérico, médula espinal cervical, médula oblongada cervical, cerebelo, tálamo e hipotálamo. Una vez tomadas las muestras, una mitad se sumergió inmediatamente en nitrógeno líquido, antes de ser preservadas a -80°C, para mantener la integridad del RNA, mientras que la otra mitad se incluyó en formalina para su fijación y posterior procesamiento mediante técnicas histológicas e IHQs.

## **II.2. Aislamiento y purificación de RNA total**

En las muestras utilizadas en el análisis genómico mediante microarrays, el aislamiento del RNA se llevó a cabo utilizando Acid Fenol-Guanidinium Thiocyanate (*Trizol*®, *Invitrogen*). El RNA obtenido se purificó con el kit NucleoSpin® RNA II (*Macherey-Nagel*). La posible contaminación con DNA genómico se eliminó mediante digestión con la enzima turbo DNasa (*Invitrogen*). Tras este tratamiento se midió la cantidad de RNA total con el espectrofotómetro NanoDrop y su calidad fue valorada en un bioanalizador *Agilent 2100*, utilizando el sistema *RNA 6000 Nano Assay* (*Agilent Technologies*).

### II.3. Hibridación de microarrays de oligo-DNA

La retrotranscripción y marcaje de los RNAs se realizó mediante el kit One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis (*Quick Amp Labeling Agilent technologies*). En primer lugar se sintetizó la primera cadena de cDNA a partir de 1 µg de RNA total con cebadores oligo dT-Promoter. Después se sintetizó el RNA complementario (cRNA) utilizando la polimerasa MMLV-RT, tal y como indica el manual de usuario. El marcaje de esta nueva cadena se realizó añadiendo a la reacción el nucleótido dCTP asociado al colorante de cianina 3 (Cy3). Para la transcripción de la segunda cadena de cDNA se utilizó la enzima T7 RNA polimerasa. El cRNA marcado se purificó con RNeasy mini spin columns (*Qiagen*) y se comprobó la correcta incorporación de los fluoróforos en un espectrofotómetro (Nanodrop).

Los microarrays de oligo-DNA (60-mer) utilizados (Sheep Gene Expression Microarray) fueron elaborados por *Agilent Technologies* (USA) usando la tecnología *SurePrint* sobre soporte de cristal. Estos microarrays fueron personalizados por el Central Veterinary Institute (CVI) de Lelystad (Holanda) usando el servicio *Agilent eArray* en línea (<http://www.chem.agilent.com>). Cada chip está formado por 4 microarrays, que contienen a su vez 45.220 sondas (*spots*), de las cuales casi 13.000 procedían de una librería de cDNA del CVI y el resto se completó con las secuencias publicadas en el NCBI y la librería de cDNA de Agilent. En total cada microarray podía detectar aproximadamente 22.000 clones ovinos.

Para la hibridación se utilizaron 1,65 µg de cDNA macado. Antes de pasar a la hibridación, los cDNAs se fragmentaron usando el 25X Fragmentation Buffer durante 30 min a 60°C. La inactivación de la enzima se produjo automáticamente en el proceso de hibridación. En este proceso se incubó cada microarray con el tampón de hibridación (2x *GEx Hybridization buffer HI-RPM, Agilent*) a 65°C con rotación a 6 rpm durante 17 horas.



Tras la hibridación, los microarrays se sometieron a una serie de lavados con distintos tampones: tampón de lavado 1 y 2, acetonitrilo y tampón de secado, sucesivamente. Inmediatamente después los arrays se escanearon usando el escáner *Gene Pix 4200 AL* (*Axon Instruments*) bajo una longitud de onda de acuerdo al espectro de absorción del fluoróforo (555 nm para *cianina 3*), para prevenir la oxidación del fluoróforo causado por el ozono del aire.

Las imágenes obtenidas del escaneado se analizaron con el programa *Agilent Feature Extraction 10.5 Image Analysis* (*Agilent Technologies*). Este programa convierte las imágenes en datos de intensidad luminosa. De esta manera se normalizaron y filtraron los datos obtenidos de la hibridación en función de la calidad de los puntos. Una vez que las imágenes fueron analizadas, los resultados se importaron al programa *GeneSpring GX v10* (*Agilent technologies*) para realizar el control de la calidad, la normalización de datos, la agrupación, la filtración y el análisis estadístico de los resultados.

#### **II.4.PCR en tiempo real**

Para llevar a cabo el análisis de transcripción génica mediante PCR a tiempo real, se ha sintetizado el cDNA a partir del RNA total. La síntesis se llevó a cabo con hexámeros al azar utilizando el kit *SuperScript First-Strand Síntesis System for RT-PCR* (*Invitrogen*) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La PCR a tiempo real se ha utilizado para estudiar y comparar de forma relativa la expresión de los genes de interés en distintas muestras. Para ello, se ha utilizado la plataforma fast SDS 7500 (*Applied Biosystems*), el intercalante del DNA (SYBR® Green) y los cebadores descritos en la Tabla 1. Para la correcta cuantificación de la expresión, hemos utilizado la media geométrica de la expresión de tres genes normalizadores (housekeeping) como factor de normalización, con el fin de disminuir el error entre las muestras que podría ser generado por pasos previos a

la cuantificación o errores del proceso experimental. Las condiciones utilizadas para la amplificación de los housekeeping fueron las descritas previamente para su uso como normalizadores en SNC de ovino con scrapie [30].

**Tabla 1: Genes analizados por PCR cuantitativa a tiempo real.** Primers (F: forward y R: reverso) usados para la amplificación génica

Gen	Secuencia de primer	Talla (bp)	Accession number (GenBank)
<b>SNC, animales preclínicos</b>			
<i>APP</i>	F: ACCCCTGACGCCGTTGAC R: TCATGACCTGGGACATCCTCTC	121	<a href="#">NM_001076796.1*</a>
<i>AQP4</i>	F: GTTCACGGAAATCTTAGCGCT R: TCAGTCCGTTTGAATCACAG	104	<a href="#">NM_181003.2*</a>
<i>CPEDI</i>	F: TTGGATGGCATCACCGACTT R: TTTGCGACCTCATGAACCAC	101	<a href="#">NM_001031771.2*</a>
<i>GOLGA4</i>	F: TCTACCAAACCCTGCCTCAA R: TCCCACTACTGGCTCTACACT	88	<a href="#">NM_001192125.1*</a>
<i>MPP7</i>	F: GCCTCTATGCCTGATGACAT R: CCCAGTGGTTCTCTATTTTTGACC	81	<a href="#">NM_001100347.1*</a>
<i>NELL2</i>	F: AAGAGGGAGACGATGGACTGAG R: ACACCAAGACCCCAAAGTCT	105	<a href="#">NM_001102084.1*</a>
<i>OSRS1**</i>	F: GAGGATCTTGTGGAACCATTGA R: TACGGACAGCTGAACCCTTTC	124	<a href="#">FQ482089.2*</a>
<i>OSRS2****</i>	F: TTGTCAGTCCCATCACCTTT R: CATTGATTTGCACAGAAAACCA	101	<a href="#">NW_003104406.1*</a>
<i>CD3G</i>	F: AGCTTCAGACAAGCAGACGCT R: GGGTTCAGTTCTTCCTCAGGTG	101	<a href="#">BC103010.1*</a>
<i>GPLY</i>	F: TCCGTGCCAGTCAATCATGA R: TGCAGACCTTGATGTCCACAC	101	<a href="#">NM_001075143.1*</a>
<i>LAPTM4B</i>	F: GGTACTTGATCCTCAATGCCG R: AAAGTCACCCCGAGTTCAGA	101	<a href="#">NM_205802.1*</a>
<i>SRSF3</i>	F: CGAAATGCATCGTGATTCTT R: AATAGCCAAAAGCTCGTTCCA	101	<a href="#">NM_001034700.1*</a>
<b>SNC, animales clínicos y preclínicos</b>			
<i>CAPN6</i>	F: TGCAGAACCCCGAGTACATCTT R: TGCGCAGGTCCTTTTGCT	81	<a href="#">NM_001192231.1*</a>
<i>COL1A2</i>	F: GCCTAGCAACATGCCAATCCT R: CGCGTGGTCTCTATCTCCA	72	<a href="#">NM_174520.2*</a>
<i>COL3A1</i>	F: CGACCAAGAATTAGACTGCCCC R: GGGAGCTGTTGGAGGCTGT	82	<a href="#">NM_001076831.1*</a>
<i>GALAI</i>	F: CTTCTCGGACCACATGCCAT R: GCCGGGCTTCGTCCTCAG	97	<a href="#">EF192581.1**</a>
<i>MT2A</i>	F: TCCTGCAGCTGTGCTGGCT R: CAGCTCTTCTTGACAGGAGGGAC	65	<a href="#">NM_001040492.1*</a>
<i>MTNR1B</i>	F: TCCGGAACGCAGGTAACCT R: GAAGATGGCCGCAAGGGT	95	<a href="#">NM_001130938.1**</a>
<b>SLR, animales clínicos y preclínicos</b>			
<i>BBOX1</i>	F: TGCAAACAATGTGGCTTACACA R: AAGCTGAACCCAGGTGGAT	85	<a href="#">NM_001101881.2*</a>
<i>CP</i>	F: GCAGCCAGATACTGCAGGGAC R: CCCGCACTGGCTCACAGTATAT	97	<a href="#">NM_001009733.1**</a>
<i>PFDN2</i>	F: GCAGGTAATTGCTGGCTTCAA	84	<a href="#">NM_001080221.2*</a>

	R: TTCAACTCCATCTCCAGCTCAG		
<i>PSMA7</i>	F: TAATGTCTGCATGGCATTTCG R: TGGCTCTGGCATTCCACC	81	<a href="#">NM_001034233.2*</a>
<i>SERPINE1</i>	F: TGTACGTGTTCGCAGGCGC R: TACAAGGGCTGTGGAGGAGGAC	83	<a href="#">NM_174137.2*</a>
<i>UCHL1</i>	F: AACTTGATGGACGGATGCCTT R: TGCAGACCTTGGCAGCGT	84	<a href="#">NM_001046172.2*</a>
<i>VEGFA</i>	F: GGGCTGCTGTAATGACGAAAGT R: GGTTCGATCCGCATAATCTGCA	81	<a href="#">NM_001025110.1**</a>

\* cDNA bovino. \*\* cDNA ovino. \*\*\*Ovine Scrapie Related Sequence 1 (OSRS1) tiene una alta identidad (92%) con la secuencia del ADN del clon de Bos taurus CH240-103G5 (número de acceso: [FQ482089.2](#)) desde 4172 hasta 4904 pb. \*\*\*\*Ovine Scrapie Related Sequence 2 (OSRS2) tiene una alta identidad (93%) con la secuencia del ADN del clon de Bos taurus : Bos\_taurus\_UMD\_3.1, whole genome shotgun sequence (número de acceso: [NW\\_003104406.1](#)) desde 2672152 hasta 2672419 pb.

## II.5. Estudio histopatológico e inmunohistoquímico

Tanto para el análisis de la patología asociada con scrapie como para la determinación de la expresión y distribución de las proteínas CAPN6, COL1A2, COL3A1, GALA1, MT2A y MTNR1B se llevaron a cabo distintas técnicas histológicas e inmunohistoquímicas. Para ello, los bloques de tejido a analizar se incluyeron durante 24 horas en una solución de formalina con un 10% de tampón salino. Posteriormente los bloques se incluyeron en parafina. Para la realización de los distintos análisis se realizaron cortes de 4µm de grosor. La espongirosis se valoró en cortes histológicos tratados con la tinción clásica de hematoxilina y eosina. Por otra parte, el depósito de PrP<sup>Sc</sup> y la determinación de CAPN6, COL1A2, COL3A1, GALA1, GFAP, MT2A y MTNR1B se valoraron mediante IHQ. Para ello se han utilizado las especificaciones de anticuerpos citadas en la Tabla 2. Para la revelación del marcaje de las proteínas se utilizó el polímero conjugado Envision (*Dako*) con el marcaje DAB (*Dako*).

**Tabla 2. Especificaciones de los anticuerpos utilizados en este trabajo**

Tipo del anticuerpo / Referencia comercial		Control positivo	IHQ	Western/dot blot
				Dilución
<b>CAPN6</b>	Rabbit polyclonal, Abcam AB76974	Placenta	1:50	1:1000
<b>COL1A2</b>	Mouse monoclonal against Collagen I, Abcam AB6308	Bazo	1:100	1:1500
<b>COL3A1</b>	Rabbit polyclonal against Collagen III, Abcam AB7778	Bazo	1:100	1: 5000
<b>GALA1</b>	Rabbit polyclonal ENZO, Life sciences BML-GA1161-0100	Tejido cerebral	1:400	1:1000
<b>GFAP</b>	Anti-GFAP, DAKO	Tejido cerebral	1:400	

<b>MT2A</b>	Mouse monoclonal against MT1 + 2, Dakocytomation M00639	Tejido cerebral	1:200	1:1500
<b>MTNR1B</b>	Rabbit polyclonal, Sigma SAB29002 12	Retina	1:100	1:1500
<b>PrP</b>	L42 R-Biopharm, Darmstadt,	Tejido cerebral	1:500	

Las preparaciones fueron examinadas con un microscopio Zeiss Axioskop 40 óptico o NIKON Eclipse 90i. Las imágenes fueron capturadas con una cámara digital (*AxioCam MRC5*) acoplada al microscopio. La cuantificación del inmunomarcaje se analizó mediante el analizador de imágenes ImageJ 1.4.3.67 (*Imagen Psion, NIH*) o de forma semicuantitativa utilizando una escala del 0 al 4.

## II.6.Extracción de proteínas y Western / Dot Blot

En este trabajo se ha valorado el nivel de expresión de CAPN6, COL1A2, COL3A1, GALA1, MT2A y MTNR1B mediante Western/Dot Blot. Para ello se realizó una extracción de proteínas de distintas áreas del SNC (cSc: Medula espinal cervical, Mobl: Medula oblongada, Cc: Cerebelo, T: Tálamo e Ht: hipotálamo). En primer lugar se homogeneizaron 0,5 g de tejido en tampón de homogenización (*Prionics AG, Zurich, Switzerland*) a una proporción final del 10 % (peso:volumen). Para la realización del Western Blot, 100 µg proteínas totales se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y posterior electrotransferencia a membranas de PVDF. Para la técnica de Dot Blot, se depositaron por duplicado 30 µg de proteína total sobre las membranas de PVDF. En ambos casos, las membranas de PVDF se trataron con solución de bloqueo y después se incubaron durante 1 h con el anticuerpo primario apropiado (Tabla 2). Tras la incubación de las membranas con los anticuerpos secundarios conjugados con HRP y la realización de los lavados con PBS, se utilizó ECL para su revelado y la formación de imágenes se realizó con el sistema VersaDoc de *Bio-Rad*. Los resultados de Western Blot se utilizaron para determinar la especificidad de los anticuerpos usados. Sin embargo, la cuantificación de las proteínas se realizó sobre la base de los resultados de Dot Blot

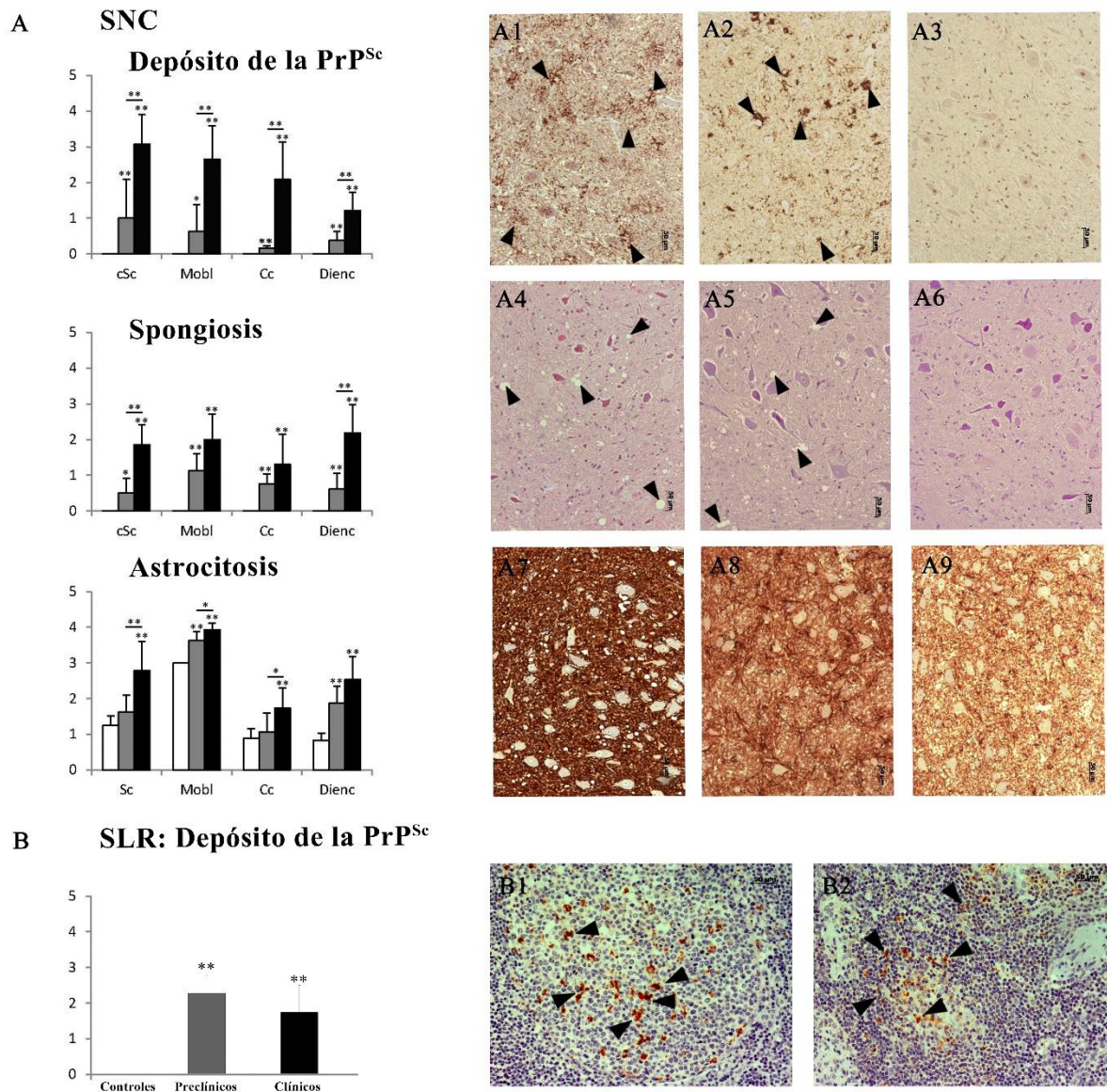
utilizando el analizador de imágenes ImageJ 1.4.3.67 (*Imagen Psion, NIH*). Los datos fueron normalizados por el reactivo Rojo Ponceau.

### **III. RESULTADOS Y DISCUSION**

#### **III.1. Lesiones relacionadas con scrapie**

La vacuolización del neuropilo de la sustancia gris o espongirosis, la gliosis reactiva medida por el inmunomarcaje de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y el depósito de la proteína prión patológica (PrP<sup>Sc</sup>) se han evaluado de manera semicuantitativa en las cuatro regiones analizadas del encéfalo (cSc: medula espinal cervical, MOBL: medula oblongada, Cc: cerebelo y Dien: diencefalo) (Figura 1A) en seis ovejas control, cuatro preclínicas y siete clínicas infectadas por scrapie. Además, utilizando los mismos animales se ha evaluado el depósito de la PrP<sup>Sc</sup> en los linfonodos mesentéricos. La distribución de estos marcadores ha sido consistente con las características descritas anteriormente en los casos del scrapie clásico [31]. El depósito de la PrP<sup>Sc</sup> y la espongirosis, se han detectado únicamente en los animales afectados (Figura 1). En el SNC, las áreas medulares en el obex, como el núcleo motor del dorsal del vago, el tracto espinal del nervio trigémino y el núcleo del tracto solitario, se han visto gravemente afectadas en el grupo de animales infectados (Figura 1 A). En el SLR, PrP<sup>Sc</sup> se ha detectado dentro de los folículos linfoides primarios y secundarios de los linfonodos. Como se puede observar en otros tejidos del SLR, se ha detectado un inmunomarcaje granular distinto en el citoplasma de los macrófagos del cuerpo tingible en las zonas oscuras y claras de los folículos linfoides. Se ha observado un depósito granular en la vecindad de las células redondas, que eran morfológicamente similares a los linfocitos B inmaduros (Figura 1B). Incluso con la alta

variabilidad observada dentro de los grupos positivos, en la mayoría de los casos las diferencias entre grupos fueron estadísticamente significativas ( $P < 0,01$  y  $P < 0,05$ ).



**Figura 1: Evaluación semicuantitativa del depósito de la PrP<sup>Sc</sup>, la degeneración esponjiforme y la expresión de la proteína glial fibrilar ácida como marcador de astrocitosis en médula espinal cervical, medula oblonga, cerebelo y diencéfalo, y del depósito de PrP<sup>Sc</sup> en linfonodos mesentéricos.** Los diagramas muestran la cuantificación de estas lesiones en animales control (barras blancas), en fase preclínica de scrapie (barras grises) y clínica (barras negras). La cuantificación se realizó de 0 (negativo), a 4 (lesión / tinción presente a la máxima intensidad). Las diferencias significativas se determinaron utilizando el test de Kruskal-Wallis (\*\*  $P < 0,05$  y \*  $p < 0,1$ ). Muestras de la medula oblonga de A1, A4 y A7: animales control, A2, A5 y A8: preclínicos y A3, A6 y A9: clínicos.

### III.2. Identificación de genes diferencialmente expresados en la médula oblongada de ovino infectado con scrapie natural en fase preclínica

En un trabajo publicado anteriormente, hemos presentado la variación de la transcripción génica en la medula oblonga en ovino naturalmente infectados por scrapie en la fase clínica. En ese trabajo, se describieron cambios en la expresión de genes que codifican proteínas extracelulares secretadas y proteasas lisosomales, y otras proteínas implicadas en la defensa y respuesta inmune y en la transducción de señales. En el trabajo actual, presentamos la variación de la transcripción génica en animales naturalmente infectados por scrapie en la fase preclínica. A diferencia de la gran cantidad de cambios observados previamente en fase clínica (93 genes con expresión modificada), en fase preclínica únicamente se identificaron 35 genes (Tabla 3) de función conocida y altamente modificados en su nivel transcripcional, de los cuales 3 estaban sobreexpresados (5,7%) y 32 subexpresados (94,3%). Estos genes codifican principalmente fosfoproteínas, proteínas de marcadores extracelulares y proteínas involucradas en la respuesta inmune y la apoptosis.

**Tabla 3: Genes identificados en medula oblonga durante la fase preclínica del scrapie con términos de GO conocidos.** La tabla presenta resultados de Blast de sondas con alteración de expresión significativa ( $P \leq 0.05$  y  $\geq 2$ -veces de cambio (FC)). Los FC de alteraciones significativas durante la fase clínica están en la última columna (NSR: no significant regulation). Los GO han sido determinados utilizando la herramienta on-line functional annotation of DAVID Bioinformatics Resources 2008 (NIAID/NIH, USA).

Término	P	Sonda	Gen	Nombre del gen	Preclinical	Clinical
					stage	stage**
					FC	
Compositionally biased region	4.90E-02	A_70_P049406	<u>EIF5</u>	Eukaryotic translation initiation factor 5, transcript variant 7	-2.65	-1.94
External side of plasma membrane	4.60E-02	A_70_P048131	<u>GPC3</u>	Glypican 3	-2.95	-2.56
Extracellular matrix binding	5.30E-02	A_70_P050511	<u>NID1</u>	Nidogen 1	-2.78	-4.15
Extracellular matrix organization	1.90E-02	A_70_P059746	<u>CYR61</u>	Cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	-2.97	-3.42
		A_70_P061221	<u>P4HA1</u>	Prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide I	-3.00	-2.81
Granzyme A mediated Apoptosis Pathway	6.20E-02	A_70_P054526	<u>ANP32A</u>	Acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member A	-2.86	-2.47
		A_70_P040956	<u>GZMB</u>	Granzyme B	-3.10	NSR
MHC protein binding	4.90E-02	A_70_P016891	<u>CD3G*</u>	CD3 Gamma chain	-3.20	NSR
		A_70_P008201	<u>CLEC7A</u>	C-type lectin domain family 7, member A	-2.20	NSR

Premios de INVESTIGACION "Enrique Coris Gruart", Convocatoria 2014

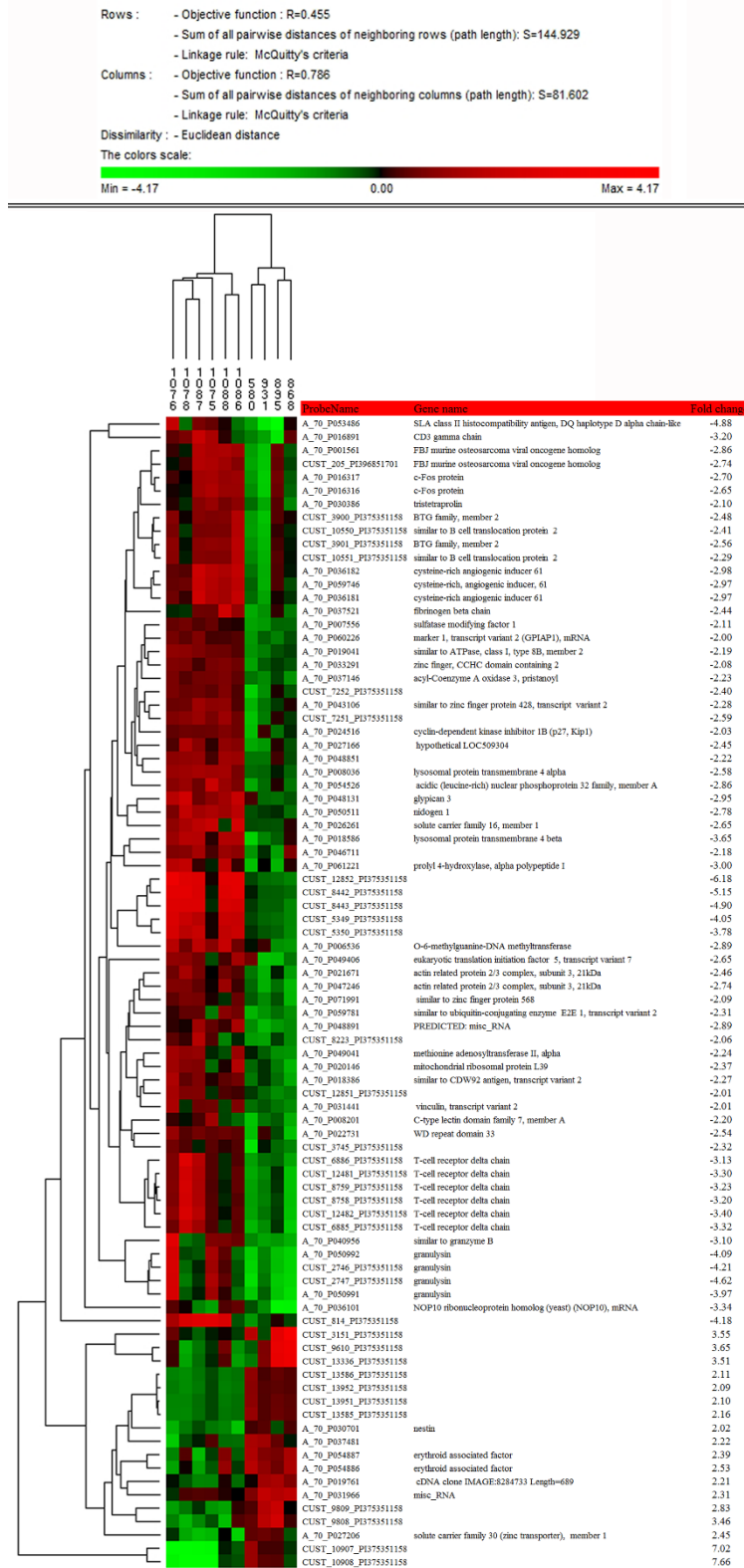
		CUST_12481_PI375351158	<u>TRD@</u>	T-cell receptor delta chain	-3.30	NSR
<b>Organelle lumen</b>	<b>6.80E-02</b>	A_70_P037521	<u>FGB</u>	Fibrinogen beta chain	-2.44	NSR
		A_70_P020146	<u>MRPL39</u>	Mitochondrial ribosomal protein L39	-2.37	NSR
		A_70_P036101	<u>NOP10</u>	NOP10 ribonucleoprotein homolog (yeast) (NOP10), mRNA	-3.34	NSR
		A_70_P007556	<u>SUMF1</u>	Sulfatase modifying factor 1	-2.11	NSR
<b>Phosphoprotein</b>	<b>1.30E-03</b>	A_70_P037146	<u>ACOX3</u>	Acyl-Coenzyme A oxidase 3, pristanoyl	-2.23	-1.73
		A_70_P021671	<u>ARPC3</u>	Actin related protein 2/3 complex, subunit 3, 21 kDa	-2.46	NSR
		A_70_P019041	<u>ATP8B2</u>	Similar to ATPase, class I, type 8B, member 2	-2.19	-1.78
		A_70_P024516	<u>CDKN1B</u>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)	-2.03	-1.71
		A_70_P001561	<u>FOS</u>	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	-2.86	-2.66
		A_70_P008036	<u>LAPTM4A</u>	Lysosomal protein transmembrane 4 alpha	-2.58	-2.10
		A_70_P018586	<u>LAPTM4B*</u>	Lysosomal protein transmembrane 4 beta	-3.65	-2.80
		A_70_P049041	<u>MAT2A</u>	Methionine adenosyl transferase II, alpha	-2.24	-1.63
		A_70_P006536	<u>MGMT</u>	PREDICTED: O-6-methylguanine-DNA methyltransferase	-2.89	-2.22
		A_70_P030701	<u>NES</u>	Nestin	2.02	2.55
		A_70_P026261	<u>SLC16A1</u>	Solute carrier family 16, member 1 (monocarboxylic acid transporter 1)	-2.65	-2.34
		A_70_P027206	<u>SLC30A1</u>	Solute carrier family 30 (zinc transporter), member 1	2.45	2.27
		A_70_P018386	<u>SLC44A1</u>	CDW92 antigen, transcript variant 2	-2.27	NSR
		A_70_P059781	<u>UBE2E1</u>	Ubiquitin-conjugating enzyme E2E 1, transcript variant 2	-2.31	NSR
		A_70_P031441	<u>VCL</u>	Vinculin, transcript variant 2	-2.01	NSR
		A_70_P022731	<u>WDR33</u>	WD repeat domain 33	-2.54	NSR
		A_70_P033291	<u>LOC618584</u>	Zinc finger, CCHC domain containing 2	-2.08	-1.87
		A_70_P043106	<u>ZNF428</u>	Zinc finger protein 428, transcript variant 2	-2.28	-2.27
<b>Response to a biotic stimulus</b>	<b>4.00E-02</b>	CUST_10550_PI375351158	<u>BTG2</u>	B cell translocation protein 2	-2.41	NSR
<b>Response to fungus</b>	<b>4.90E-02</b>	A_70_P050991	<u>GNLY*</u>	Granulysin	-3.97	NSR
<b>Tight junction assembly</b>	<b>5.60E-02</b>	A_70_P003466	<u>MPP7</u>	membrane protein, palmitoylated 7 (MAGUK p55 subfamily member 7) (MPP7), mRNA	2.93	NSR

\*Genes elegidos para la validación con RT-PCR cuantitativa

\*\*Valores de FC obtenidos en un estudio anterior de nuestro grupo utilizando animales en la fase clínica de scrapie [32]

Tras el análisis de agrupamiento (*clustering*), los animales se agruparon de acuerdo a su condición de enfermedad (Figura 2) lo que demuestra la homogeneidad de los cambios de expresión en los distintos grupos.





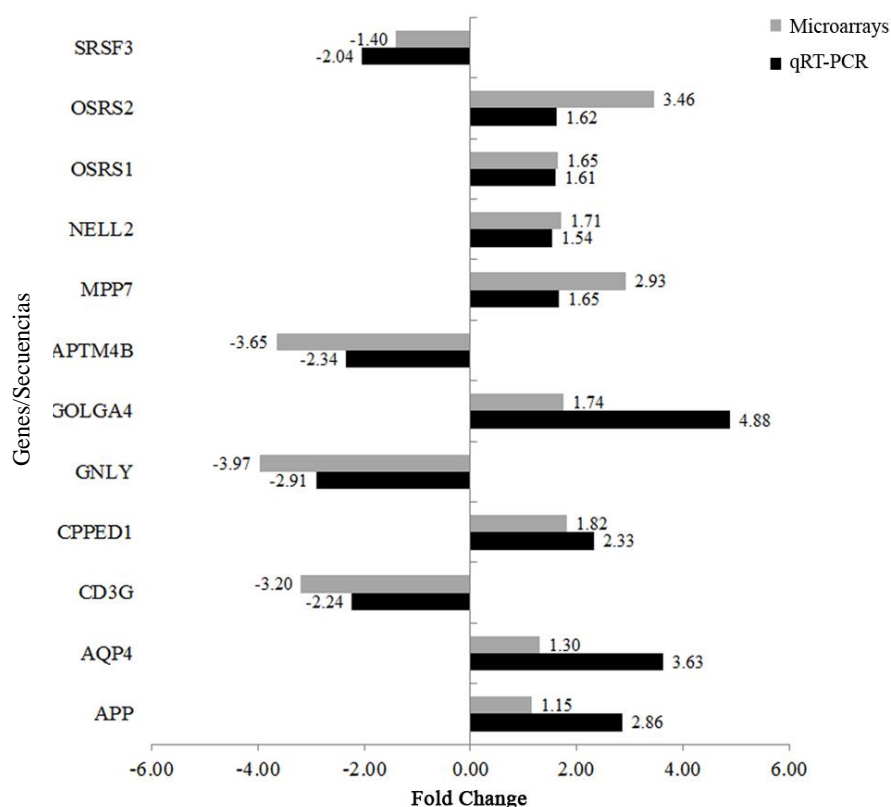
**Figura 2: Agrupamiento de los animales en función de sus perfiles de expresión.** Se realizó el análisis de conglomerados jerárquico (algoritmo de agrupamiento según distancia euclidiana) utilizando PermutMatrix [33] y los resultados de expresión de 86 sondas / genes con diferenciación significativa de transcripción en la médula oblonga de animales con scrapie en fase preclínica con respecto a los controles. Los colores representan el nivel de expresión. La información de la muestra aparece en la parte superior. Los nombres de los genes identificados están indicados. Los distintos patrones de transcripción entre las distintas condiciones (control y preclínicos) permiten agrupar los animales en sus respectivos grupos.

Estos estudios son los primeros que han analizado perfiles transcripcionales masivos utilizando la técnica de microarray en muestras de casos naturales de la enfermedad del scrapie. La determinación de la variación del transcriptoma en condiciones naturales de la enfermedad ha puesto de manifiesto nuevos genes potencialmente implicados en algunos de los mecanismos moleculares de la patología inducida por priones. Los resultados confirman cambios de expresión génica previamente publicados y observados en modelos murinos infectados experimentalmente con el scrapie [17-20, 22, 34-37].

Algunos estudios *in vitro* han mostrado variaciones en el fosfo-proteoma de las células N2a después de la infección con PrP<sup>Sc</sup> [38] y en los perfiles inflamatorios específicos en microglía [39]. Además, los genes implicados en la defensa, la respuesta inmune y genes que codifican para proteínas extracelulares secretadas se regulan diferencialmente en modelos murinos durante la infección con el prion [18]. En la fase clínica del scrapie ovino clásico, los genes implicados en el transporte y la unión a iones, unión a nucleótidos y en el sistema inmunológico se expresan diferencialmente [32]. De acuerdo con estas observaciones *in vitro*, en modelos murinos y en la fase clínica de scrapie ovino, los genes diferencialmente regulados en este estudio, codifican fosfo-proteínas, proteínas de la organización de la matriz extracelular y proteínas relacionadas con la respuesta inmune. Por lo tanto, estos mecanismos parecen estar implicados en la neuropatología del scrapie desde fases tempranas de la enfermedad.

Con el fin de validar los resultados del microarray, se analizaron mediante la técnica de PCR en tiempo real los cambios en la expresión de doce genes en medula oblongada durante la fase preclínica de la enfermedad. Cuatro genes de ellos presentan un FC mayor a 2: la CD3 gamma (*CD3G*), la granulicina (*GNLY*), la proteína lisosómica de transmembrana 4 (*LAPTM4*) y Maguk p55 miembro de la subfamilia 7 (*MPP7*) (Figura 3).

La selección de estos genes se basó en su asociación previa con otras prionopatías y enfermedades neurodegenerativas y también por su posible participación en los mecanismos implicados en la neurodegeneración. La PCR a tiempo real confirmó los resultados de expresión de microarrays (Figura 3). El alto ajuste entre los FC (Fold Change; veces que varía la expresión) obtenidos con microarray y PCR cuantitativa refleja la alta fiabilidad del array y el análisis de la alineación de secuencias.



**Figura 3: Confirmación de los resultados de microarrays por PCR a tiempo real.** Expresión diferencial de los genes seleccionados analizados por microarrays y PCR a tiempo real, en medula oblonga de animales preclínicos.

La realización de la PCR en tiempo real confirmó la subexpresión de 2 genes implicados en la respuesta inmune (*CD3G* y *GNLY*) [40, 41], este resultado sugiere la disminución de la actividad inmune durante la enfermedad priónica, en concordancia con otras enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer [42]. Otro gen que disminuye su expresión durante la fase preclínica del scrapie codifica para la proteína lisosómica de

transmembrana 4 (LAPTM4), la cual podría tener un papel en la degradación del prion [43].

### **III.3. Identificación de genes diferencialmente expresados en el SLR de ovino con scrapie natural**

En el SLR, hemos analizado los patrones de expresión génica en muestras de linfonodos mesentéricos de animales infectados naturalmente con scrapie en las fases clínica y preclínica de la enfermedad. La linfoinvasión por el prion tras la ingestión del mismo constituye un hecho atractivo para la identificación de biomarcadores en la investigación de las enfermedades priónicas. Este proceso ocurre en la fase preclínica, antes de la neuroinvasión, por lo que se puede considerar un momento óptimo para el diagnóstico precoz o para una potencial intervención terapéutica [14]. Este estudio presenta por primera vez un análisis del perfil transcripcional masivo utilizando la técnica de microarray de muestras del sistema linfoide de casos naturales de la enfermedad de scrapie.

En los linfonodos mesentéricos, se identificaron un total de 139 genes con funciones conocidas que presentaban un cambio mayor o igual que 2 veces el nivel transcripcional en los controles, de ellos 105 se regulaban de forma diferencial en la fase clínica (43 genes sobreexpresados (40.95%) y 62 genes subexpresados (59,05%)) y 50 en la fase preclínica (12 genes sobreexpresados (24%) y 38 genes subexpresados (76%)). Estos genes se agrupan en distintos grupos funcionales en función de las proteínas que codifican, tales como: glicoproteínas, proteínas de la región y matriz extracelular, involucradas en el ciclo celular y splicing alternativo, péptido señal, supresores tumorales, implicadas en el metabolismo de ácidos grasos, procesos metabólicos del ácido fosfatídico, con actividad de dimerización de las proteínas y proteínas relacionadas con el transporte de iones metálicos (Tabla 4).

**Tabla 4: Genes identificados en linfonodos mesentéricos durante las fases clínica y preclínica del scrapie con términos de GO conocidos.** La tabla presenta resultados de Blast de sondas con alteración de expresión significativa ( $P \leq 0.05$  y  $\geq 2$ -veces de cambio (FC)). Los GO han sido determinados utilizando la herramienta on-line funcional annotation of DAVID Bioinformatics Resources 2008 (NIAID/NIH, USA), (C, Clínicos; FC, Fold change; NC, controles negativos; PC, Preclínicos). Se citan los estudios previos que han descrito la expresión alterada de los genes identificados en casos experimentales de scrapie.

Término	P	Sonda	FC (C vs NC)	FC (PC vs NC)	Gen	Nombre del gen	Citas
glycoprotein	5.16E-04	A_70_P042906	2.22	1.00	<i>AQP1</i>	<u>aquaporin 1 (Colton blood group)</u>	
		CUST_5666_PI3753 51158	-2.02	-1.16	<i>AQP4</i>	<u>aquaporin 4</u>	[44]
		A_70_P041077	2.09	1.39	<i>PTGER3</i>	<u>prostaglandin E receptor 3 (subtype EP3)</u>	
		A_70_P030356	1.48	-2.06	<i>SLC11A1</i>	<u>solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 1</u>	
		A_70_P051037	-2.09	2.85	<i>SLC2A5</i>	<u>solute carrier family 2 (facilitated glucose/fructose transporter), member 5</u>	[44]
A_70_P036386	-1.29	-2.01	<i>UCHL1*</i>	<u>ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (ubiquitin thiolesterase)</u>			
extracellular region	5.37E-04	CUST_2502_PI3753 51158	2.26	2.76	<i>BMPER</i>	<u>BMP binding endothelial regulator</u>	
		A_70_P006426	4.26	1.06	<i>FGL1</i>	<u>fibrinogen-like 1</u>	
		A_70_P069571	2.05	1.93	<i>FIBIN</i>	<u>fin bud initiation factor homolog (zebrafish)</u>	
		A_70_P038041	1.95	-3.63	<i>HP</i>	<u>haptoglobin</u>	[44]
		CUST_3439_PI3753 51158	2.70	1.38	<i>PIGR</i>	<u>polymeric immunoglobulin receptor</u>	
		A_70_P035871	1.03	-3.29	<i>SERPINE1*</i>	<u>serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1</u>	
		A_70_P039451	-1.57	-2.28	<i>SFN</i>	<u>stratifin</u>	
A_70_P050922	2.19	-1.06	<i>VEGFA*</i>	<u>vascular endothelial growth factor A</u>			
disulfide bond	1.10E-03	CUST_598_PI3753 1158	2.28	1.33	<i>FABP5</i>	<u>fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)</u>	
		A_70_P070736	-3.83	-1.06	<i>TXNRD1</i>	<u>thioredoxin reductase 1</u>	
cell cycle	1.17E-03	A_70_P058586	-2.85	-1.55	<i>PSMA7*</i>	<u>proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 7</u>	
		A_70_P057841	-1.61	-2.51	<i>BRCA2</i>	<u>breast cancer 2, early onset</u>	
		A_70_P053686	1.11	-2.01	<i>CCNDBP1</i>	<u>cyclin D-type binding-protein 1</u>	
		A_70_P060136	-1.48	-2.04	<i>CGREF1</i>	<u>cell growth regulator with EF-hand domain 1</u>	
		A_70_P027076	-2.79	-1.28	<i>EID1</i>	<u>EP300 interacting inhibitor of differentiation 1</u>	
		A_70_P007666	-2.87	-1.61	<i>KIF2C</i>	<u>kinesin family member 2C</u>	
		A_70_P011891	-2.34	-1.29	<i>MND1</i>	<u>meiotic nuclear divisions 1 homolog (S. cerevisiae)</u>	
		A_70_P009551	-2.13	-1.07	<i>NCAPG</i>	<u>non-SMC condensin I complex, subunit G</u>	
		A_70_P037556	-2.12	1.01	<i>NDC80</i>	<u>NDC80 homolog, kinetochore complex component (S. cerevisiae)</u>	
		A_70_P034256	-2.20	1.05	<i>TFDP2</i>	<u>transcription factor Dp-2 (E2F dimerization partner 2)</u>	
		A_70_P061801	-2.01	-1.39	<i>UBE2C</i>	<u>ubiquitin-conjugating enzyme E2C</u>	
		A_70_P061801	-2.01	-1.39	<i>UBE2C</i>	<u>ubiquitin-conjugating enzyme E2C</u>	
		condensed chromosome	1.71E-03	CUST_7895_PI3753 51158	-2.79	-1.15	<i>HMGB1</i>
A_70_P003816	-2.20			-1.67	<i>TEX12</i>	<u>testis expressed 12</u>	
alternative splicing	2.04E-03	A_70_P059171	-2.57	-2.17	<i>CLTA</i>	<u>clathrin, light chain (Lca)</u>	
		A_70_P033441	1.13	2.27	<i>MEST</i>	<u>mesoderm specific transcript homolog (mouse)</u>	
		A_70_P039536	-2.86	-1.34	<i>MX1</i>	<u>myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse)</u>	
		A_70_P060791	2.25	1.38	<i>PEG3</i>	<u>paternally expressed 3</u>	
		A_70_P015446	-1.52	-2.13	<i>UNC50</i>	<u>unc-50 homolog (C. elegans)</u>	
chromosome	2.20E-03	A_70_P065046	-2.68	-1.32	<i>JRKL</i>	<u>jerky homolog-like (mouse)</u>	
		A_70_P040916	-2.62	-1.67	<i>ORC1L</i>	<u>origin recognition complex, subunit 1-like (yeast)</u>	
		CUST_12205_PI375 351158	-2.04	-1.20	<i>TOP2A</i>	<u>topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa</u>	[45]
extracellular matrix	3.15E-03	A_70_P021711	-2.19	-1.69	<i>COL1A1</i>	<u>collagen, type I, alpha 1</u>	[44, 46]
		CUST_11292_PI375 351158	2.40	1.12	<i>CRISPLD2</i>	<u>cysteine-rich secretory protein LCCL domain containing 2</u>	
		A_70_P007356	2.20	1.26	<i>DCN</i>	<u>decorin</u>	[44, 46]
		CUST_7449_PI375 51158	1.46	-2.05	<i>DPT</i>	<u>dermatopontin</u>	
		A_70_P032476	2.45	-1.35	<i>MFAP5</i>	<u>microfibrillar associated protein 5</u>	[44]
		A_70_P058626	2.27	1.13	<i>VWF</i>	<u>von Willebrand factor</u>	
A_70_P064081	2.44	-2.18	<i>CA4</i>	<u>carbonic anhydrase IV</u>			

Premios de INVESTIGACION "Enrique Coris Gruart", Convocatoria 2014

signal peptide	3.25E-03	A_70_P061221	1.20	-2.43	<i>P4HA1</i>	<u>prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide I</u>	[44, 47]
		A_70_P040831	-2.09	-1.07	<i>SELL</i>	<u>selectin L</u>	
tumor suppressor	1.47E-02	A_70_P035971	2.05	-1.75	<i>VWASA</i>	<u>von Willebrand factor A domain containing 5A</u>	
		A_70_P026737	3.11	-1.41	<i>WT1</i>	<u>Wilms tumor 1</u>	
		A_70_P061691	1.26	2.26	<i>HPGD</i>	<u>hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15-(NAD)</u>	
cytoplasm	1.82E-02	A_70_P016337	-1.78	-2.72	<i>HMMR</i>	<u>hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM)</u>	
		CUST_12176_PI375351158	-1.04	-2.92	<i>ACTG2</i>	<u>actin, gamma 2, smooth muscle, enteric</u>	
		A_70_P019656	1.01	3.59	<i>ADH1A</i>	<u>alcohol dehydrogenase 1A (class I), alpha polypeptide</u>	
		A_70_P045301	3.70	2.33	<i>BBOX1*</i>	<u>butyrobetaine (gamma), 2-oxoglutarate dioxygenase (gamma-butyrobetaine hydroxylase) 1</u>	
		A_70_P069971	-2.09	-1.73	<i>CDC42E P5</i>	<u>CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 5</u>	
		CUST_5823_PI375351158	1.12	2.07	<i>NIN</i>	<u>ninein (GSK3B interacting protein)</u>	
		A_70_P018021	-3.25	-1.15	<i>PAIP2</i>	<u>poly(A) binding protein interacting protein 2</u>	
		A_70_P054126	-2.16	-1.11	<i>PHAX</i>	<u>phosphorylated adaptor for RNA export</u>	
		A_70_P044246	1.26	-2.14	<i>RRAGD</i>	<u>Ras-related GTP binding D</u>	
		A_70_P055106	2.05	1.07	<i>SORBS2</i>	<u>sorbin and SH3 domain containing 2</u>	
		A_70_P025726	-2.39	-1.60	<i>STMN2</i>	<u>stathmin-like 2</u>	
fatty acid metabolism	2.26E-02	A_70_P060991	-2.80	1.21	<i>CA3</i>	<u>carbonic anhydrase III, muscle specific</u>	
		CUST_8730_PI375351158	1.06	-2.05	<i>ACSL4</i>	<u>acyl-CoA synthetase long-chain family member 4</u>	
		A_70_P039986	-1.27	2.39	<i>SLC27A2</i>	<u>solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 2</u>	
phosphatidic acid metabolic process	2.86E-02	A_70_P039726	-2.50	-1.10	<i>AGPAT1</i>	<u>1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 1 (lysophosphatidic acid acyltransferase, alpha)</u>	
		A_70_P025121	-3.34	-1.30	<i>PLA2G2 A</i>	<u>phospholipase A2, group IIA (platelets, synovial fluid)</u>	
protein dimerization activity	2.91E-02	CUST_206_PI396851701	2.04	-2.28	<i>FOS</i>	<u>v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</u>	[44, 45, 47]
		CUST_10535_PI375351158	-2.41	-2.41	<i>NFE2L1</i>	<u>nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 1</u>	
Zinc finger, C2H2-type	3.09E-02	CUST_13307_PI375351158	-2.34	-1.26	<i>ATMIN</i>	<u>ATM interactor</u>	
		A_70_P036056	-2.65	-1.71	<i>KLF6</i>	<u>Kruppel-like factor 6</u>	
		A_70_P065371	-2.27	-1.13	<i>ZCCHC6</i>	<u>zinc finger, CCHC domain containing 6</u>	
		A_70_P014286	1.33	2.01	<i>ZNF45</i>	<u>zinc finger protein 45</u>	
cytoplasmic membrane-bounded vesicle	3.21E-02	A_70_P062831	-3.71	-1.48	<i>EHD3</i>	<u>EH-domain containing 3</u>	
		A_70_P044621	2.27	-1.04	<i>MALL</i>	<u>mal, T-cell differentiation protein-like</u>	
metal ion transport	3.39E-02	A_70_P030126	-2.36	1.24	<i>CP*</i>	<u>ceruloplasmin (ferroxidase)</u>	[44, 46]
		CUST_12632_PI375351158	2.28	1.50	<i>KCTD12</i>	<u>potassium channel tetramerisation domain containing 12</u>	
		A_70_P027206	2.15	2.10	<i>SLC30A1</i>	<u>solute carrier family 30 (zinc transporter), member 1</u>	[44, 47]
		A_70_P050456	-2.65	-1.58	<i>SLC38A1 0</i>	<u>solute carrier family 38, member 10</u>	
Antimicrobial	5.05E-02	CUST_139_PI396851701	15.26	-1.74	<i>CATHL1</i>	<u>cathelicidin 1</u>	
		CUST_3993_PI375351158	5.96	-1.25	<i>S100A8</i>	<u>S100 calcium binding protein A8</u>	[44]
Apoptosis	5.45E-02	CUST_260_PI396851701	-2.04	-1.55	<i>CARD6</i>	<u>caspase recruitment domain family, member 6</u>	
		A_70_P022526	-2.29	-1.16	<i>OPA1</i>	<u>optic atrophy 1 (autosomal dominant)</u>	
		A_70_P049526	-1.12	-2.70	<i>PERP</i>	<u>PERP, TP53 apoptosis effector</u>	
		A_70_P069836	-3.14	-1.31	<i>RNF130</i>	<u>ring finger protein 130</u>	
		A_70_P067091	-2.90	-1.55	<i>UBE2Z</i>	<u>ubiquitin-conjugating enzyme E2Z</u>	
Immunoglobulin-like fold	5.55E-02	A_70_P036361	2.06	2.09	<i>CD1E</i>	<u>CD1e molecule</u>	
		CUST_9656_PI375351158	-2.03	1.11	<i>FGFR2</i>	<u>fibroblast growth factor receptor 2</u>	
		CUST_12141_PI375351158	2.64	-1.00	<i>IGK</i>	<u>Ig kappa chain</u>	
Secreted	5.70E-02	A_70_P016986	-2.23	1.16	<i>TRD@</i>	<u>T cell receptor delta locus</u>	[47]
		A_70_P048761	1.34	-2.27	<i>SPINK5</i>	<u>serine peptidase inhibitor, Kazal type 5</u>	
		CUST_9580_PI375351158	1.13	-2.49	<i>MMRNI</i>	<u>multimerin 1</u>	
		CUST_10101_PI375351158	-1.07	-2.53	<i>NPNT</i>	<u>nephronectin</u>	

Premios de INVESTIGACION "Enrique Coris Gruart", Convocatoria 2014

		A_70_P034356	2.88	1.19	<i>SEMA3G</i>	<u>sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3G</u>	
		A_70_P063891	2.38	-1.22	<i>PCOLCE2</i>	<u>procollagen C-endopeptidase enhancer 2</u>	
<b>GTP binding</b>	7.49E-02	A_70_P019676	4.33	1.16	<i>ACSM1</i>	<u>acyl-CoA synthetase medium-chain family member 1</u>	[44]
		A_70_P046951	-2.24	-1.02	<i>ARLAC</i>	<u>ADP-ribosylation factor-like 4C</u>	
		A_70_P008796	-2.06	1.15	<i>DOCK11</i>	<u>dedicator of cytokinesis 11</u>	
		A_70_P000126	-3.63	-1.82	<i>GBP4</i>	<u>guanylate binding protein 4</u>	
<b>disulfide bond</b>	7.58E-02	A_70_P018376	2.56	-1.08	<i>FAP</i>	<u>fibroblast activation protein, alpha</u>	
		A_70_P041321	-2.15	-2.57	<i>IGHA2</i>	<u>immunoglobulin heavy constant alpha 2 (A2m marker)</u>	
<b>structural molecule activity</b>	8.04E-02	A_70_P028306	-2.03	-1.05	<i>LMNB1</i>	<u>lamin B1</u>	
		CUST_13373_PI375351158	-2.15	-1.29	<i>LOC531679</i>	<u>ribosomal protein L17-like; similar to 60S ribosomal protein L17 (L23); similar to ribosomal protein L17; similar to Rpl17 protein; similar to mCG3798</u>	
		CUST_7057_PI375351158	-2.33	-1.07	<i>LOC789587</i>	<u>similar to Ribosomal L22 domain containing protein RGD1359290</u>	
<b>positive regulation of inflammatory response</b>	9.48E-02	A_70_P031441	-2.43	-1.79	<i>VCL</i>	<u>vinculin</u>	[47]
		A_70_P058551	8.25	-1.12	<i>FABP4</i>	<u>fatty acid binding protein 4, adipocyte</u>	
		CUST_9779_PI375351158	-1.40	-2.38	<i>IDO1</i>	<u>indoleamine 2,3-dioxygenase 1</u>	
<b>Other</b>		CUST_13467_PI375351158	1.29	-2.14	<i>FBP2</i>	<u>fructose-1,6-bisphosphatase 2</u>	
		A_70_P055306	2.77	1.50	<i>SLC43A1</i>	<u>solute carrier family 43, member 1</u>	
		A_70_P049406	-1.99	-2.32	<i>EIF5</i>	<u>eukaryotic translation initiation factor 5</u>	[47]
		A_70_P070931	-2.87	-1.18	<i>NUDT19</i>	<u>nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 19</u>	
		A_70_P036101	1.22	-3.18	<i>NOPI0</i>	<u>NOPI0 ribonucleoprotein homolog (yeast)</u>	[47]
		A_70_P011091	-2.74	-2.01	<i>PFDN2*</i>	<u>prefoldin subunit 2</u>	
		A_70_P039656	17.20	-1.52	<i>BAC5</i>	<u>5 kDa bactinecin precursor</u>	
		A_70_P061341	-1.03	-2.94	<i>C11ORF10</i>	<u>chromosome 11 open reading frame 10</u>	
		A_70_P061266	2.36	1.03	<i>C5ORF43</i>	<u>chromosome 5 open reading frame 43</u>	
		A_70_P051377	14.99	-1.48	<i>CATHL1B</i>	<u>procyelic dodecapeptide</u>	
		A_70_P015101	-2.70	-1.03	<i>CCDC82</i>	<u>coiled-coil domain containing 82</u>	
		A_70_P012541	-1.02	-2.36	<i>CNN1</i>	<u>calponin 1, basic, smooth muscle</u>	
		A_70_P002841	2.03	1.48	<i>EPAS</i>	<u>endothelial PAS domain protein 1</u>	
		A_70_P008841	-2.18	-1.23	<i>EPST11</i>	<u>epithelial stromal interaction 1 (breast)</u>	
		A_70_P060756	-2.12	1.08	<i>FAM190B</i>	<u>KIAA1128</u>	
		A_70_P062951	2.05	1.12	<i>FNDC3B</i>	<u>fibronectin type III domain containing 3B</u>	[45]
		A_70_P051181	2.76	1.28	<i>HSD11K</i>	<u>NAD-dependent 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase</u>	
		CUST_46_PI396851701	-2.06	-2.15	<i>IGHA</i>	<u>immunoglobulin heavy constant alpha</u>	
		A_70_P024671	2.46	1.31	<i>INHBB</i>	<u>inhibin, beta B</u>	
		A_70_P033656	-2.34	-1.77	<i>ISG12(A)</i>	<u>ISG12(a) protein-like</u>	
		A_70_P012537	-2.19	-3.58	<i>LGALS15</i>	<u>galectin 15</u>	
		CUST_3620_PI375351158	-1.58	-2.22	<i>LGALS16</i>	<u>beta-galactoside-binding lectin</u>	
		A_70_P020131	-1.10	-3.84	<i>LGALS9C</i>	<u>lectin, galactoside-binding, soluble, 9C</u>	
		CUST_6089_PI375351158	-2.02	-1.71	<i>LOC100140018</i>	<u>similar to cytochrome P450, family 2, subfamily J</u>	
		A_70_P016801	-2.20	-1.48	<i>LOC443321</i>	<u>lysozyme 2a precursor</u>	
		A_70_P026671	-1.91	-2.05	<i>LOC524810</i>	<u>IgM</u>	
		A_70_P023026	3.09	1.74	<i>LOC615697</i>	<u>similar to cytochrome P450</u>	
		A_70_P039266	-2.03	-1.83	<i>LOC654331</i>	<u>pancreatitis-associated protein I</u>	[44]
		A_70_P039271	-3.94	-7.40	<i>MCP-4</i>	<u>mast cell proteinase-4</u>	
		CUST_11558_PI375351158	2.00	2.23	<i>MGC140754</i>	<u>hypothetical LOC508613</u>	
		CUST_9725_PI375351158	-2.26	-3.77	<i>PLAC8</i>	<u>placenta-specific 8</u>	
		CUST_10114_PI375351158	2.56	1.15	<i>RN18S1</i>	<u>18S ribosomal RNA</u>	
		A_70_P030132	-2.40	-1.71	<i>RTP4</i>	<u>receptor (chemosensory) transporter protein 4</u>	[48]

\*Genes elegidos para la validación con RT-PCR cuantitativa

Al igual que en el caso del estudio genómico en la médula oblongada, el análisis del agrupamiento (*clustering*) permitió agrupar a los distintos individuos en función de su cuadro clínico (Figura 4), confirmando la validez de estos cambios ya que parecen homogéneos en los distintos grupos.

Los genes diferencialmente expresados en el SLR codifican proteínas ubicadas en casi todas las localizaciones subcelulares: membranas (glicoproteínas), matriz extracelular, citoplasma y cromosomas. Estas proteínas participan en procesos celulares generales tales como el ciclo celular, la apoptosis, el *splicing* alternativo y condensación de cromosomas. Genes asociados con el metabolismo de glicoproteínas, la matriz extracelular y el ciclo celular se regulan diferencialmente en células esplénicas sin leucocitos de ratones infectados con scrapie [46].



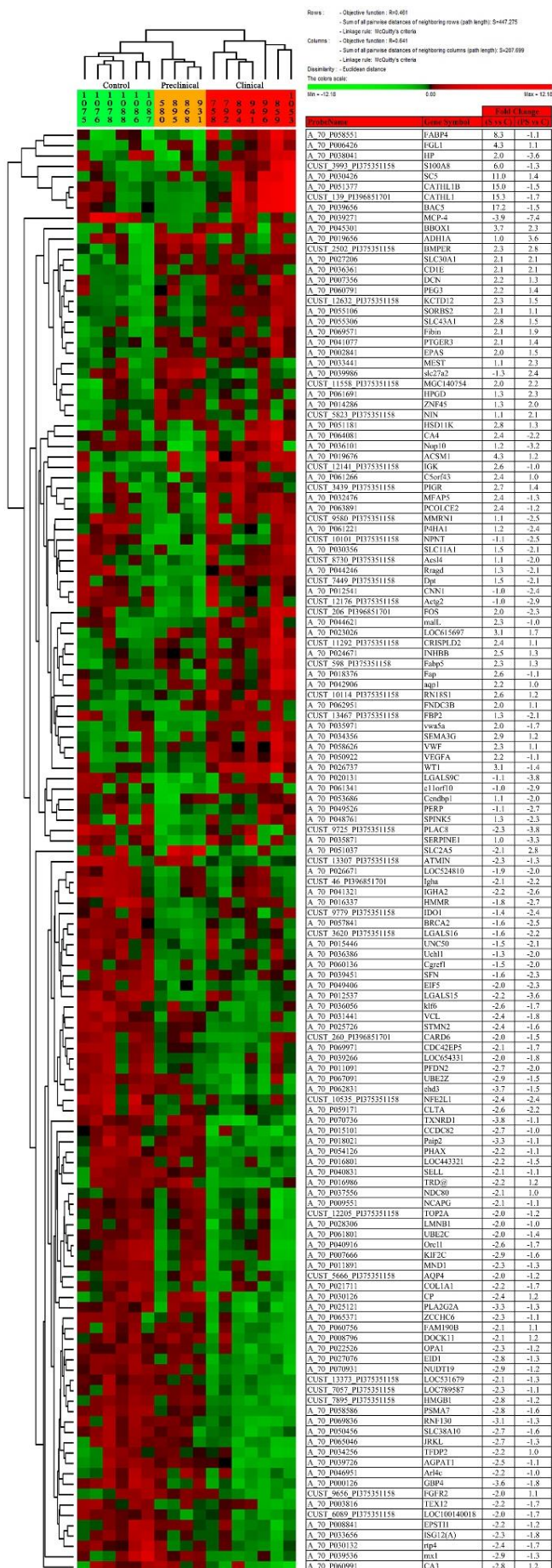
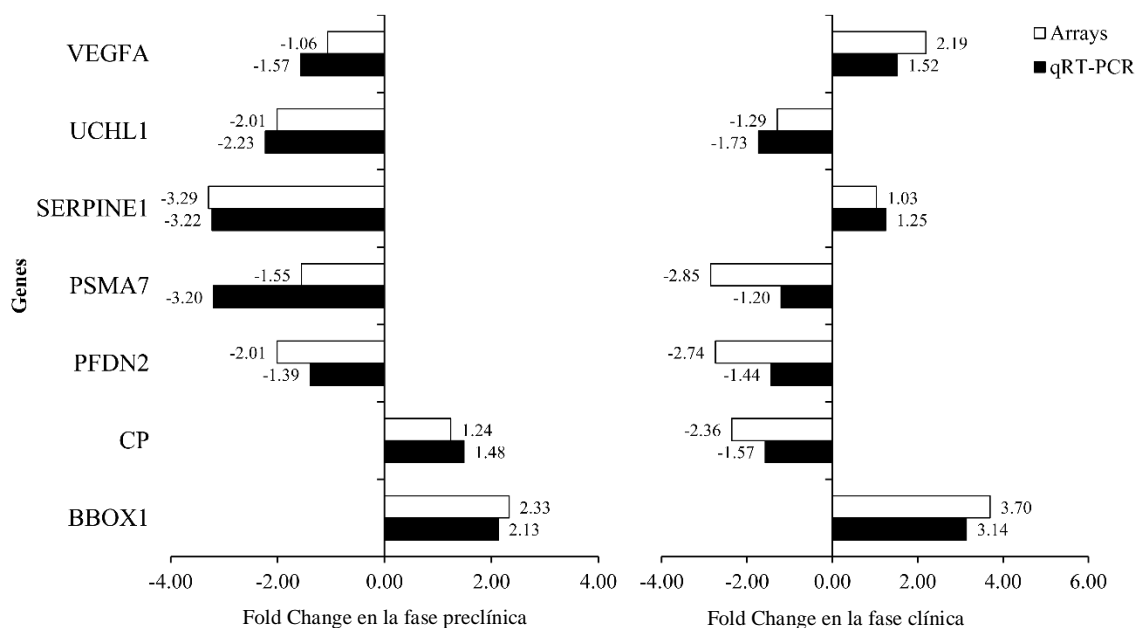


Figura 4: Árboles de agrupamiento de los animales en función de sus perfiles de expresión. Se realizó el análisis de agrupamiento jerárquico (algoritmo de agrupamiento según distancia euclidiana) utilizando PermutMatrix [33] y los resultados de expresión de 139 genes con expresión diferencial en linfonodos mesentéricos de animales clínicos y preclínicos. Los colores representan el nivel de expresión. La información de la muestra aparece en la parte superior. Los nombres de los genes identificados están indicados. Los distintos patrones de transcripción entre las distintas condiciones (control, preclínicos y clínicos) permiten agrupar los individuos en función de su condición clínica.

Algunos de los genes diferencialmente transcritos que hemos identificado en este estudio codifican proteínas que pueden estar involucrados en la patogénesis de las enfermedades asociadas con el mal plegamiento de las proteínas (proteínas implicadas en la unión disulfuro, unión a GTP y la dimerización de proteínas). La expresión diferencial de algunos de estos genes ha sido descrita en otros tejidos de ratones infectados con scrapie [18, 22, 34].

Los cambios en la expresión de once genes se validaron mediante la técnica de PCR en tiempo real. Los genes confirmados fueron: la gamma-butirotetrahidroxi-lasa (*BBOX1*), ceruloplasmina (*CP*), subunidad 2 de la prefoldina (*PFDN2*), subunidad alfa del proteosoma tipo -7 (*PSMA7*), inhibidor del activador del plasminógeno-1 (*SERPINE1*), ubiquitina hidrolasa carboxi-terminal L1 (*UCHL1*) y factor de crecimiento vascular endotelial (*VEGFA*). Los genes seleccionados fueron aquellos que mostraron los mayores cambios de expresión por lo menos en uno de los dos grupos de animales infectados de scrapie. La PCR a tiempo real confirmó los resultados de expresión de microarrays (Figura 5). El alto ajuste entre los FC obtenidos con microarray y PCR cuantitativa refleja una vez más la alta fiabilidad del array y el análisis de la alineación de secuencias.

La PCR a tiempo real confirmó la subexpresión de los genes implicados en la regulación del mal plegamiento de las proteínas (*PFDN2*, *PSMA7* y *UCHL1*). Este resultado está en coherencia con el deterioro de la función del proteosoma que se ha descrito en las enfermedades priónicas [49]. Así mismo, se ha implicado a la proteína PFDN2 en casos de la enfermedad de Alzheimer [50]. La disminución de la expresión de estos genes podría facilitar el mal plegamiento de la proteína prion, y por lo tanto contribuir a la formación de priones patológicos. Por otra parte, hemos observado la sobreexpresión de genes implicados en la promoción de la angiogénesis en los linfonodos (*SERPINE1* y *VEGFA*) [51, 52] durante la fase clínica del scrapie, esto podría facilitar la difusión de priones. Además, el déficit de CP que tiene un papel primordial en el metabolismo normal del hierro y que protege contra la pérdida neuronal [53] podría contribuir a la toxicidad del prión. Finalmente, confirmamos la sobreexpresión de *BBOX1*, gen que codifica para una proteína con importantes actividades antioxidantes y anti radicales libres [54], esta variación podría estar implicada en una respuesta sistémica del organismo al estrés oxidativo inducido por priones.

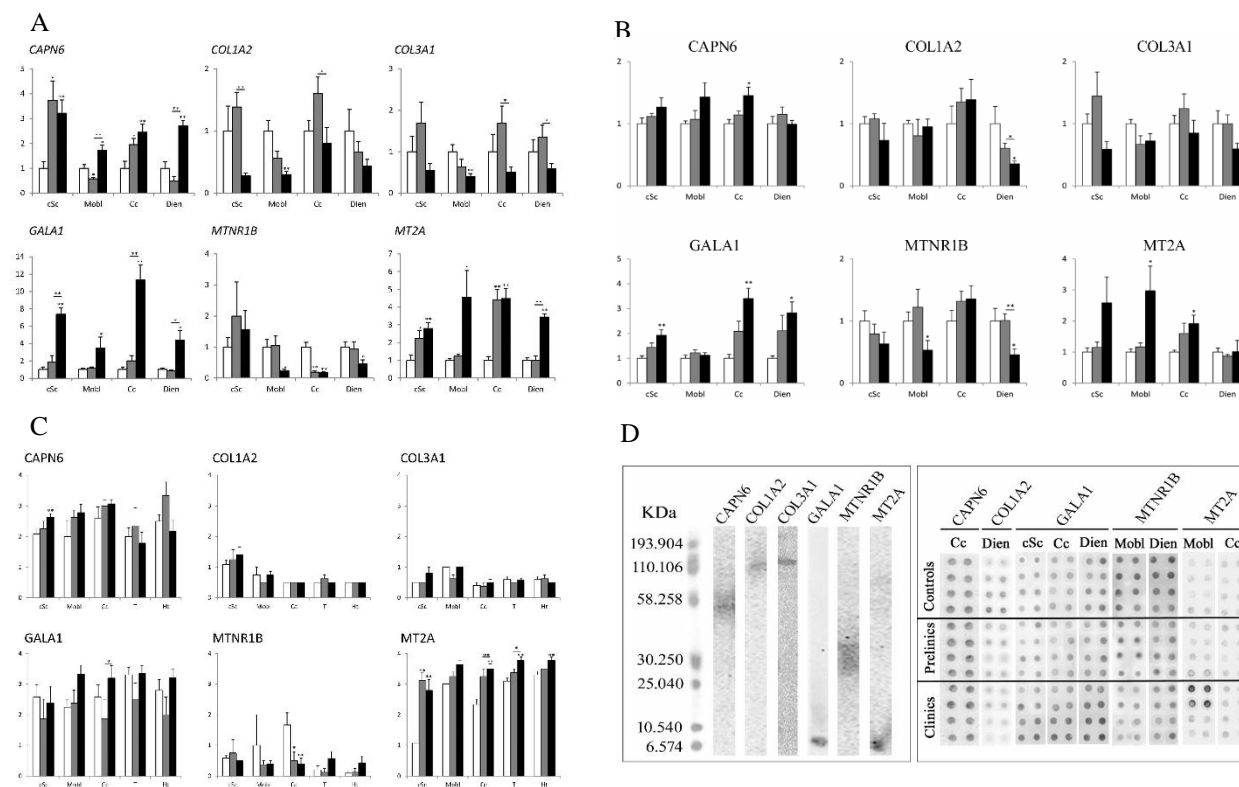


**Figura 5: Confirmación de los resultados de microarrays por PCR a tiempo real.** Expresión diferencial de los genes seleccionados analizados por microarrays y PCR a tiempo real en linfonodos mesentéricos de animales clínicos y preclínicos.

#### III.4. Perfil de expresión génica y proteico de seis potenciales biomarcadores asociados con scrapie en SNC durante la fase clínica y preclínica la enfermedad

Como paso final en el trabajo de búsqueda de biomarcadores de scrapie y en el análisis de los mecanismos moleculares implicados en estas patologías nos planteamos una validación a nivel proteico de seis potenciales biomarcadores génicos identificados previamente en un análisis genómico en SNC de ovino con scrapie en fase clínica [32]. El trabajo en el que identificamos estos marcadores se desarrolló con la misma metodología que la que hemos utilizado en nuestro trabajo de microarrays. Así, nuestro objetivo era confirmar 6 potenciales biomarcadores asociados con la enfermedad del scrapie (CAPN6, COL1A2, COL3A1, GALA1, MT2A y MTNR1B) a nivel proteico, en las fases preclínica y clínica de la enfermedad, en distintas áreas del encéfalo y utilizando un número amplio de animales. Para cumplir con este objetivo analizamos el nivel transcripcional de estos 6 genes en muestras de médula espinal cervical, médula oblongada, cerebelo, tálamo e hipotálamo (Figura 6A). Además, valoramos el nivel de expresión de las proteínas

codificadas por estos genes utilizando dos técnicas: IHQ y Western/Dot Blot (Figura 6B, C y D).



**Figura 6: Perfiles de transcripción génica y expresión proteica de seis genes relacionados con scrapie.** (CAPN6, COL1A2, COL3A1, GALA1, MTNR1B y MT2A) en cuatro regiones del sistema nervioso central (médula espinal cervical, médula oblonga, cerebelo y diencéfalo) en animales control (barras blancas), preclínicos (barras grises) y clínicos (barras negras). Las diferencias entre grupos se analizaron mediante el *t* test de Student ( $*P < 0,05$  y  $**P < 0,01$ ) en casos de transcripción génica (A), y expresión proteica mediante Dot Blot (B y D) y mediante el test de Mann Whitney ( $**P < 0,05$  and  $*P < 0,1$ ) en caso de expresión proteica mediante IHQ (C) (valoración semicuantitativa).

Según nuestro conocimiento, no se ha publicado el perfil del inmunomarcaje de los marcadores elegidos en el SNC ovino, únicamente está descrita la distribución de MT1+2 [7]. Por ello, proporcionamos una descripción breve del patrón de inmunotinción para cada anticuerpo.

#### III.4.1. COL1A2 y COL3A1

El marcaje del colágeno 1A2 (COL1A2) fue intenso en las células perivasculares y leptomeninges, en cambio, era muy débil o estaba ausente en las paredes de los vasos sanguíneos de tamaño mediano dentro del parénquima nervioso. El inmunomarcaje del

colágeno 3A1 (COL3A1) fue positivo tanto en las leptomeninges como en las paredes de los vasos sanguíneos dentro del parénquima nervioso, especialmente en la médula espinal (Figura 7 C y D).

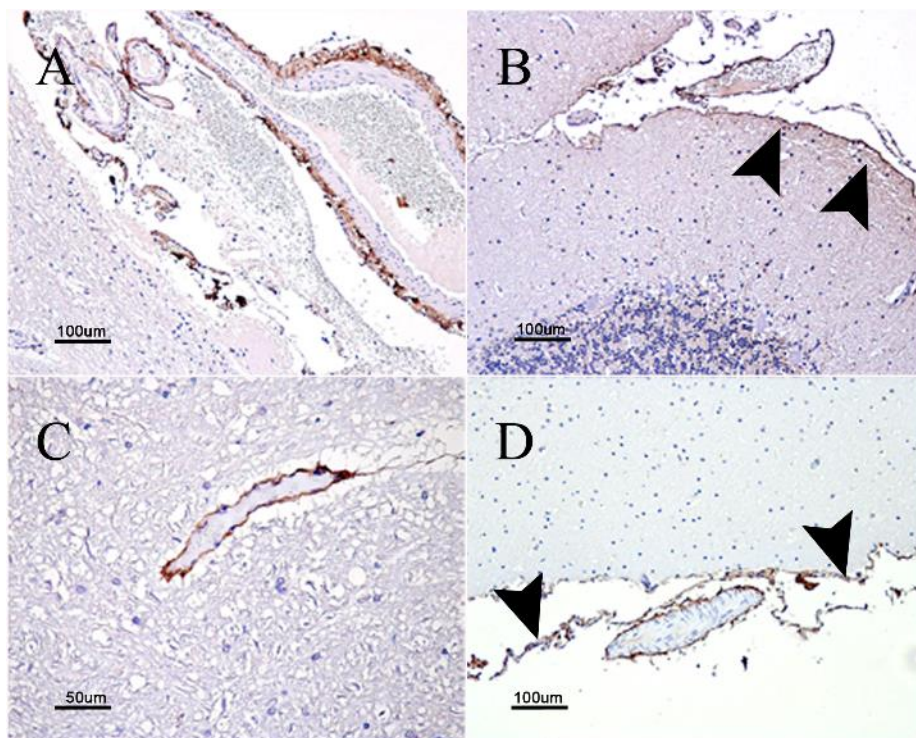


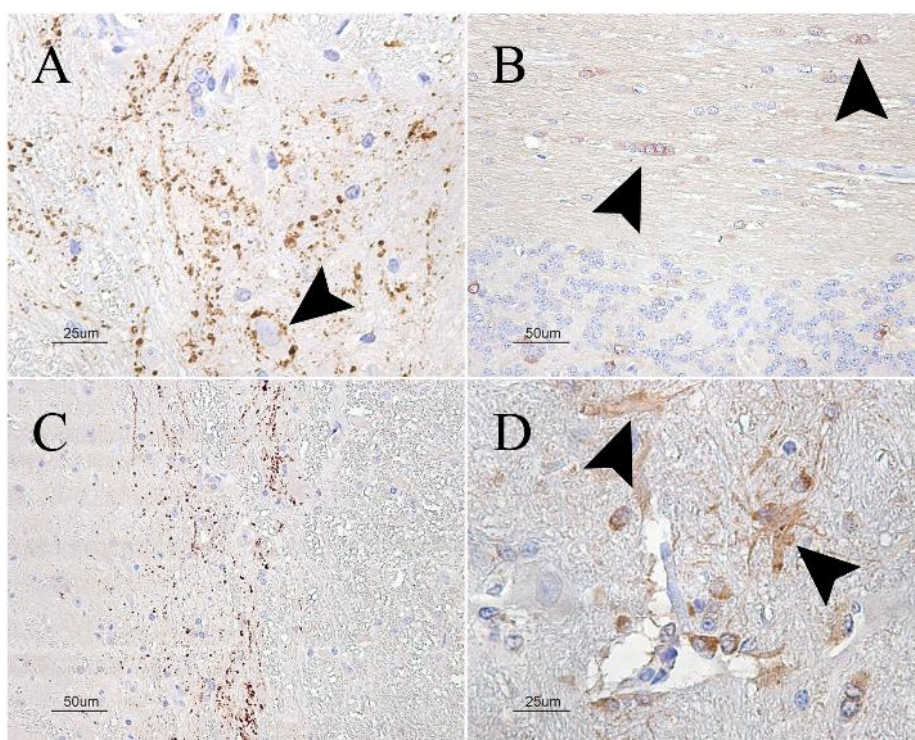
Figura 7: Patrones del inmunomarcaje del COL1A2 (A y B) y el COL3A1 (C y D) en médula espinal.

Los dos genes *COL1A2* y *COL3A1* disminuyen significadamente en médula oblonga durante la fase clínica del scrapie (Figura 6 A). Sin embargo, las proteínas codificadas por estos genes no cambian de expresión de manera significativa en ningún área del encéfalo, salvo *COL1A2* que disminuye en el diencéfalo de los animales clínicos (Figura 6 B). Se ha descrito una disminución del *COL6A1* en la enfermedad de Alzheimer [55]. Además, la sobreexpresión del *COL25A1* conduce al desarrollo de una enfermedad parecida al Alzheimer [56]. Nuestros resultados de expresión proteica no son concluyentes y se necesitan más estudios para clarificar el papel de la matriz extracelular en las enfermedades priónicas.



### III.4.2. GALA1

Se ha observado un inmunomarcaje puntiforme de la galanina 1 (GALA1) en varias regiones del cerebro, como en el núcleo de tracto solitario de la médula oblonga (Figura 8 A) o en la *sustancia gelatinosa* del asta dorsal de la médula espinal (Figura 8 C). En el cerebelo, algunos tipos celulares con inmunomarcaje positivo para GALA1 pueden ser identificados por morfología como células gliales, tanto oligodendrocito (Figura 8 B) como astrocitos (Figura 8 D).



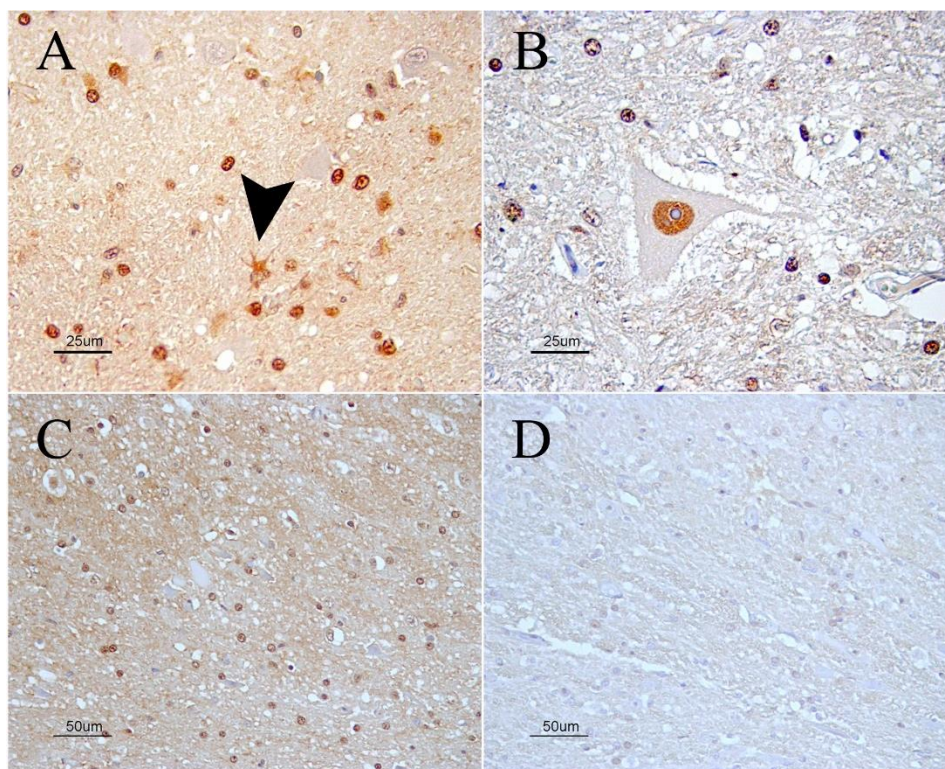
**Figura 8: Patrones del inmunomarcaje de la GALA1 en animales control.** A: Medula oblonga, B: Sustancia blanca del cerebelo, C: Hasta dorsal de la medula espinal (*Substantia gelatinosa*), D: mesencéfalo.

La galanina es un neuropéptido inhibitorio con un rol neuroprotector [57, 58]. El gen *GALA1* se sobreexpresa en casos de la enfermedad de Alzheimer [59, 60]. En este trabajo *GALA1* aumenta significativamente en todas las áreas analizadas durante la fase clínica de la enfermedad, y el inmunoblot revela casi los mismos cambios (Figura 6 A y B). La distribución de la GALA1 observado en ovejas es similar en comparación con el inmunomarcaje descrito en otras especies. Sin embargo, es la primera vez que se ha descrito la presencia del inmunomarcaje de la GALA1 en el cerebelo. Este cambio en el cerebelo,

que es el más alto en todas las áreas analizadas (Figura 6 B y C), puede estar relacionado con los signos clínicos del scrapie como la ataxia.

### III.4.3. CAPN6

El citoplasma de las neuronas no ha presentado generalmente un inmunomarcaje de la calpaina 6 (CAPN6), por el contrario los núcleos mostraron una fuerte reactividad, con la excepción de los nucléolos (Figura 9 B). Además, se ha observado un marcaje fuerte en las células gliales en la sustancia blanca, principalmente en los núcleos pero también en el citoplasma (Figura 9 A).



**Figura 9: Inmunomarcaje de la CAPN6.** A: Tálamo, B: Medula espinal cervical, C: Hasta dorsal de un animal clínico que presenta un marcaje fuerte en comparación con D: misma área en un animal control.

Las calpaínas son cisteína proteasas intracelulares, no-lisosomales, dependientes del calcio, que están involucradas en el proteólisis, la muerte celular apoptótica, la necrosis y otros eventos fisiológicos. Algunas calpaínas se sobrexpresan en modelos murinos de scrapie [61, 62] y otros eventos neurodegenerativos, contribuyendo también a la patología de la enfermedad de Alzheimer [63-65] y de Parkinson [66]. Este estudio ha mostrado un

aumento estadísticamente significado en la transcripción del gen *CAPN6* en todas las áreas analizadas durante la fase clínica del scrapie y en la medula espinal y el cerebelo durante la fase preclínica (Figura 6 A). En concordancia con los resultados de la transcripción génica, se ha observado una tendencia hacia un aumento del inmunomarcaje y el inmunoblot de la proteína de la calpaina 6 en la mayoría de las áreas analizadas. Este aumento es significativo en la medula espinal y el cerebelo (Figura 6 B, C y D).

El aumento del marcaje de la *CAPN6* durante la fase clínica en el neuropilo, especialmente en el asta dorsal de la medula espinal (Figura 9 C), podría estar relacionado con la nocicepción, debido a que esta área contiene vías sensoriales. Cambios a este nivel podrían estar relacionados con algunos signos clínicos del scrapie como la hiperestesia y prurito.

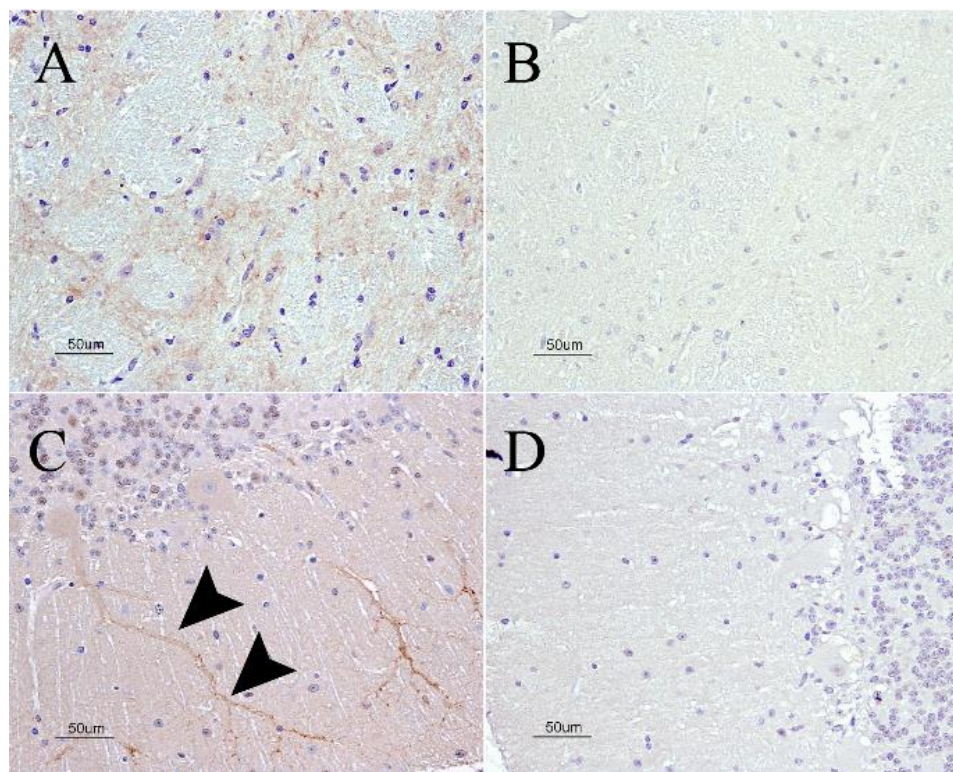
#### III.4.4. *MTNR1B*

Se observó una tinción del receptor de la melatonina 1B (*MTNR1B*) en la sustancia gris, sin embargo, la sustancia blanca fue negativa. Esta tinción fue particularmente intensa en el asta dorsal de la medula espinal (Figura 10 A). En el cerebelo, las dendritas de las células de Purkinje presentan ocasionalmente un fuerte inmunomarcaje citoplasmático (Figura 10 C).

La melatonina puede proteger de la forma tóxica de  $A\beta$ , especialmente a nivel mitocondrial [67, 68], y se ha utilizado como antioxidante en pacientes con la enfermedad de Alzheimer [69]. Nuestros resultados muestran una disminución de la transcripción del gen del receptor de la melatonina 1B (*MTNR1B*) en medula oblonga, cerebelo y diencéfalo en animales clínicos, y en cerebelos de animales preclínicos (Figura 6 A). De la misma manera la expresión de la proteína *MTNR1B* disminuyó en las mismas áreas en animales



clínicos (Figura 6 B y C). Estos resultados sugieren la contribución del receptor de la melatonina en la patología del scrapie ovino, incluso en la fase temprana de la enfermedad.



**Figura 10: Inmunomarcaje del MTNR1B.** A: Núcleo del tracto solitario en medula oblonga de un animal control, B: misma área en un animal clínico, C: La capa molecular del cerebelo de un animal control, D: misma área en un animal clínico.

#### III.4.5. MT 1 Y 2

Las metalotioneínas 1 y 2 (MT 1 y 2) son proteínas relacionadas con el estrés celular reguladas por metales [70]. Además del aumento previamente descrito para *MT2A* en medula oblonga durante la fase clínica del scrapie [44], hemos observado un aumento significativo de este gen en todas las áreas analizadas en animales clínicos y en medula espinal y cerebelo de animales preclínicos (Figura 6 A). El aumento de la proteína MT2 se confirmó por Dot-Blot (Figura 6 B, C y D). Estos resultados están en concordancia con previas descripciones de las metalotioneínas en scrapie y otros EETs [71-75], confirmando su posible papel en el estrés oxidativo presente en la patogénesis de estas enfermedades neurodegenerativas.

#### **IV. CONCLUSIONES**

La aplicación por primera vez de un análisis transcriptómico masivo, utilizando la técnica de microarray, en muestras procedentes de ovejas infectadas naturalmente con scrapie, ha dado lugar a resultados de alta fiabilidad, tal y como lo demuestra la validación de los cambios transcripcionales de 11 genes mediante PCR en tiempo real. El análisis genómico permitió la identificación de nuevos genes implicados en la patología del scrapie natural en médula oblongada cervical y linfonodos mesentéricos, en las fases clínica y preclínica de la enfermedad. Asimismo, confirmó la variación en genes previamente descrita en otros análisis genómicos en muestras procedentes de modelos murinos infectados experimentalmente con scrapie. Además, los resultados confirman en el scrapie natural la alteración de genes que se han descrito anteriormente como biomarcadores en otras enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob en la especie humana, poniendo de manifiesto la relación entre la enfermedad del scrapie y otras enfermedades neurodegenerativas.

El análisis del cambio en el transcriptoma en médula oblongada confirma la alteración en la matriz extracelular y en las proteínas de unión a iones y la implicación del sistema inmune y de las proteasas lisosomales en la neuropatología del scrapie natural. Además, los cambios en los niveles de expresión de genes que codifican para proteínas relacionadas con el contacto célula-célula, las vías metabólicas de tráfico reciclado y la transducción de señales podrían desempeñar un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. En los linfonodos mesentéricos, la subexpresión de genes implicados en la reparación del mal plegamiento del prión, la regulación de genes implicados en la promoción de la angiogénesis y el déficit en la ceruloplasmina podrían contribuir a la formación de priones, a su difusión y a la toxicidad de los mismos, respectivamente y la

regulación diferencial de *BBOX1* podría estar implicada en una respuesta sistémica del organismo al estrés oxidativo inducido por priones.

Finalmente, la confirmación de las variaciones a nivel proteico de genes que mostraron grandes diferencias de expresión, permite proponer a CAPN6, GALA1, MTNR1B y MT2A como posibles nuevos biomarcadores del scrapie ovino y también como dianas terapéuticas de esta enfermedad.

## V. BIBLIOGRAFÍA

1. Aguzzi, A., et al., *PrP-expressing tissue required for transfer of scrapie infectivity from spleen to brain*. Nature, 1997. **389**(6646): p. 69-73.
2. Chesebro, B., *Human TSE disease--viral or protein only?* Nat Med, 1997. **3**(5): p. 491-2.
3. Bons, N., et al., *Natural and experimental oral infection of nonhuman primates by bovine spongiform encephalopathy agents*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(7): p. 4046-51.
4. Will, R.G., *Variant Creutzfeldt-Jakob disease*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2002. **72**(3): p. 285-6.
5. Hunter, N., *Scrapie and experimental BSE in sheep*. Br Med Bull, 2003. **66**: p. 171-83.
6. Poser, C.M.U.-h.w.s.c.s.a.B.T.F.-W.S.-e.e.a.b.c.a., *Notes on the history of the prion diseases. Part I*. Clinical Neurology and Neurosurgery, 2002. **104**(1): p. 1-9.
7. Vidal, E., et al., *Immunohistochemical characterisation of classical scrapie neuropathology in sheep*. J Comp Pathol, 2009. **141**(2-3): p. 135-46.
8. Fraser, H., *The pathology of a natural and experimental scrapie*. Front Biol, 1976. **44**: p. 267-305.
9. Prusiner, S.B., *Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie*. Science, 1982. **216**(4542): p. 136-44.
10. Prusiner, S.B., *The prion diseases*. Brain Pathol, 1998. **8**(3): p. 499-513.
11. Prusiner, S.B., *Prions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(23): p. 13363-83.
12. Jeffrey, M. and L. Gonzalez, *Classical sheep transmissible spongiform encephalopathies: pathogenesis, pathological phenotypes and clinical disease*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2007. **33**(4): p. 373-94.
13. van Keulen, L.J., M.E. Vromans, and F.G. van Zijderveld, *Early and late pathogenesis of natural scrapie infection in sheep*. Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica, 2002. **110**(1): p. 23-32.
14. Aucouturier, P. and C. Carnaud, *The immune system and prion diseases: a relationship of complicity and blindness*. Journal of Leukocyte Biology, 2002. **72**(6): p. 1075-83.
15. Andreoletti, O., et al., *Early accumulation of PrPsc in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie*. Journal of General Virology, 2000. **81**: p. 3115-3126.
16. van Keulen, L.J., M.E. Vromans, and F.G. van Zijderveld, *Early and late pathogenesis of natural scrapie infection in sheep*. APMIS, 2002. **110**(1): p. 23-32.

17. Dandoy-Dron, F., et al., *Gene expression in scrapie. Cloning of a new scrapie-responsive gene and the identification of increased levels of seven other mRNA transcripts.* J Biol Chem, 1998. **273**(13): p. 7691-7.
18. Booth, S., et al., *Identification of central nervous system genes involved in the host response to the scrapie agent during preclinical and clinical infection.* J Gen Virol, 2004. **85**(Pt 11): p. 3459-71.
19. Brown, A.R., et al., *Identification of up-regulated genes by array analysis in scrapie-infected mouse brains.* Neuropathol Appl Neurobiol, 2004. **30**(5): p. 555-67.
20. Riemer, C., et al., *Gene expression profiling of scrapie-infected brain tissue.* Biochem Biophys Res Commun, 2004. **323**(2): p. 556-64.
21. Xiang, W., et al., *Identification of differentially expressed genes in scrapie-infected mouse brains by using global gene expression technology.* Journal of Virology, 2004. **78**(20): p. 11051-60.
22. Skinner, P.J., et al., *Gene expression alterations in brains of mice infected with three strains of scrapie.* BMC Genomics, 2006. **7**: p. 114.
23. Guillerme-Bosselut, F., et al., *Glycosylation-related gene expression profiling in the brain and spleen of scrapie-affected mouse.* Glycobiology, 2009. **19**(8): p. 879-89.
24. Sorensen, G., et al., *Comprehensive transcriptional profiling of prion infection in mouse models reveals networks of responsive genes.* BMC Genomics, 2008. **9**: p. 114.
25. Cosseddu, G.M., et al., *Gene expression profiling on sheep brain reveals differential transcripts in scrapie-affected/not-affected animals.* Brain Res, 2007. **1142**: p. 217-22.
26. Khaniya, B., et al., *Microarray analysis of differentially expressed genes from Peyer's patches of cattle orally challenged with bovine spongiform encephalopathy.* Journal of Toxicology and Environmental Health Part A, 2009. **72**(17-18): p. 1008-13.
27. Basu, U., et al., *Gene expression alterations in Rocky Mountain elk infected with chronic wasting disease.* Prion, 2012. **6**(3): p. 282-301.
28. Xiang, W., et al., *Cerebral gene expression profiles in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease.* Ann Neurol, 2005. **58**(2): p. 242-57.
29. Bolea, R., et al., *Comparison of immunohistochemistry and two rapid tests for detection of abnormal prion protein in different brain regions of sheep with typical scrapie.* J Vet Diagn Invest, 2005. **17**(5): p. 467-9.
30. Lyahyai, J., et al., *Effect of scrapie on the stability of housekeeping genes.* Anim Biotechnol, 2010. **21**(1): p. 1-13.
31. Vidal, E., et al., *Assessment of calcium-binding proteins (Parvalbumin and Calbindin D-28K) and perineuronal nets in normal and scrapie-affected adult sheep brains.* J Virol Methods, 2006. **136**(1-2): p. 137-46.
32. Filali, H., et al., *Gene expression profiling and association with prion-related lesions in the medulla oblongata of symptomatic natural scrapie animals.* PLoS ONE. **6**(5): p. e19909.
33. Caraux, G. and S. Pinloche, *PermutMatrix: a graphical environment to arrange gene expression profiles in optimal linear order.* Bioinformatics, 2005. **21**(7): p. 1280-1.
34. Xiang, W., et al., *Identification of differentially expressed genes in scrapie-infected mouse brains by using global gene expression technology.* J Virol, 2004. **78**(20): p. 11051-60.

35. Julius, C., et al., *Transcriptional Stability of Cultured Cells upon Prion Infection* (vol 375, pg 1222, 2008). Journal of Molecular Biology, 2009. **388**(1): p. 207-207.
36. Stanton, J.B., et al., *Limited transcriptional response of ovine microglia to prion accumulation*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **386**(2): p. 345-350.
37. Fasano, C., et al., *Gene expression profile of quinacrine-cured prion-infected mouse neuronal cells*. Journal of Neurochemistry, 2008. **105**(1): p. 239-250.
38. Wagner, W., et al., *Quantitative phosphoproteomic analysis of prion-infected neuronal cells*. Cell Commun Signal. **8**: p. 28.
39. Baker, C.A. and L. Manuelidis, *Unique inflammatory RNA profiles of microglia in Creutzfeldt-Jakob disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(2): p. 675-9.
40. Flanagan, B.F., et al., *DNase hypersensitivity and methylation of the human CD3G and D genes during T-cell development*. Immunogenetics, 1990. **31**(1): p. 13-20.
41. Hogg, A.E., et al., *Induction of granulysin in CD8+ T cells by IL-21 and IL-15 is suppressed by human immunodeficiency virus-1*. J Leukoc Biol, 2009. **86**(5): p. 1191-203.
42. Richartz-Salzburger, E., et al., *Altered lymphocyte distribution in Alzheimer's disease*. J Psychiatr Res, 2007. **41**(1-2): p. 174-8.
43. Heiseke, A., Y. Aguib, and H.M. Schatzl, *Autophagy, prion infection and their mutual interactions*. Curr Issues Mol Biol. **12**(2): p. 87-97.
44. Filali, H., et al., *Gene expression profiling and association with prion-related lesions in the medulla oblongata of symptomatic natural scrapie animals*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e19909.
45. Gossner, A., et al., *Transcriptional profiling of peripheral lymphoid tissue reveals genes and networks linked to SSBP/1 scrapie pathology in sheep*. Vet Microbiol, 2011. **153**(3-4): p. 218-28.
46. Huzarewich, R.L., et al., *Transcriptional modulation in a leukocyte-depleted splenic cell population during prion disease*. J Toxicol Environ Health A, 2011. **74**(22-24): p. 1504-20.
47. Filali, H., et al., *Medulla oblongata transcriptome changes during presymptomatic natural scrapie and their association with prion-related lesions*. BMC Genomics, 2012. **13**(1): p. 399.
48. Kim, H.O., et al., *Prion disease induced alterations in gene expression in spleen and brain prior to clinical symptoms*. Adv Appl Bioinform Chem, 2008. **1**: p. 29-50.
49. Deriziotis, P. and S.J. Tabrizi, *Prions and the proteasome*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1782**(12): p. 713-22.
50. Broer, L., et al., *Association of HSP70 and its co-chaperones with Alzheimer's disease*. J Alzheimers Dis, 2011. **25**(1): p. 93-102.
51. Bajou, K., et al., *Host-derived plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) concentration is critical for in vivo tumoral angiogenesis and growth*. Oncogene, 2004. **23**(41): p. 6986-90.
52. Hirakawa, S., et al., *VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis*. J Exp Med, 2005. **201**(7): p. 1089-99.
53. Dexter, D.T., et al., *Alterations in levels of iron, ferritin, and other trace metals in neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia*. The Royal Kings and Queens Parkinson's Disease Research Group. Ann Neurol, 1992. **32** Suppl: p. S94-100.
54. Gulcin, I., *Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine*. Life Sci, 2006. **78**(8): p. 803-11.

55. Cheng, J.S., et al., *Collagen VI protects neurons against Abeta toxicity*. Nat Neurosci, 2009. **12**(2): p. 119-21.
56. Mohan, H., et al., *Extracellular matrix in multiple sclerosis lesions: Fibrillar collagens, biglycan and decorin are upregulated and associated with infiltrating immune cells*. Brain Pathol, 2010. **20**(5): p. 966-75.
57. Mitsukawa, K., X. Lu, and T. Bartfai, *Galanin, galanin receptors and drug targets*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(12): p. 1796-805.
58. Counts, S.E., et al., *Neuroprotective role for galanin in Alzheimer's disease*. EXS, 2010. **102**: p. 143-62.
59. Counts, S.E., S.E. Perez, and E.J. Mufson, *Galanin in Alzheimer's disease: neuroinhibitory or neuroprotective?* Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(12): p. 1842-53.
60. Counts, S.E., et al., *Galanin hyperinnervation upregulates choline acetyltransferase expression in cholinergic basal forebrain neurons in Alzheimer's disease*. Neurodegener Dis, 2008. **5**(3-4): p. 228-31.
61. O'Donovan, C.N., D. Tobin, and T.G. Cotter, *Prion protein fragment PrP-(106-126) induces apoptosis via mitochondrial disruption in human neuronal SH-SY5Y cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(47): p. 43516-23.
62. Guo, Y., et al., *Remarkable reduction of MAP2 in the brains of scrapie-infected rodents and human prion disease possibly correlated with the increase of calpain*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e30163.
63. Patrick, G.N., et al., *Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration*. Nature, 1999. **402**(6762): p. 615-22.
64. Lee, M.S., et al., *Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain*. Nature, 2000. **405**(6784): p. 360-4.
65. LaFerla, F.M., *Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease*. Nat Rev Neurosci, 2002. **3**(11): p. 862-72.
66. Vanderklis, P.W. and B.A. Bahr, *The pathogenic activation of calpain: a marker and mediator of cellular toxicity and disease states*. Int J Exp Pathol, 2000. **81**(5): p. 323-39.
67. Dragicevic, N., et al., *Melatonin treatment restores mitochondrial function in Alzheimer's mice: a mitochondrial protective role of melatonin membrane receptor signaling*. J Pineal Res, 2011. **51**(1): p. 75-86.
68. Olcese, J.M., et al., *Protection against cognitive deficits and markers of neurodegeneration by long-term oral administration of melatonin in a transgenic model of Alzheimer disease*. J Pineal Res, 2009. **47**(1): p. 82-96.
69. Cardinali, D.P., A.M. Furio, and L.I. Brusco, *Clinical aspects of melatonin intervention in Alzheimer's disease progression*. Curr Neuropharmacol, 2010. **8**(3): p. 218-27.
70. Palmiter, R.D., *Molecular biology of metallothionein gene expression*. Experientia Suppl, 1987. **52**: p. 63-80.
71. Hanlon, J., et al., *Metallothionein in bovine spongiform encephalopathy*. J Comp Pathol, 2002. **127**(4): p. 280-9.
72. Tortosa, R., et al., *Stress response in the central nervous system of a transgenic mouse model of bovine spongiform encephalopathy*. Vet J, 2008. **178**(1): p. 126-9.
73. Duguid, J.R., R.G. Rohwer, and B. Seed, *Isolation of cDNAs of scrapie-modulated RNAs by subtractive hybridization of a cDNA library*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(15): p. 5738-42.
74. Duguid, J.R. and M.C. Dinauer, *Library subtraction of in vitro cDNA libraries to identify differentially expressed genes in scrapie infection*. Nucleic Acids Res, 1990. **18**(9): p. 2789-92.

75. Diedrich, J.F., et al., *Scrapie-associated prion protein accumulates in astrocytes during scrapie infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(2): p. 375-9.

## **INDICE**

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	2
<b>II. METODOLOGÍA UTILIZADA</b> .....	4
<b>II.1. Animales y obtención de muestras</b> .....	4
<b>II.2. Aislamiento y purificación de RNA total</b> .....	5
<b>II.3. Hibridación de microarrays de oligo-DNA</b> .....	6
<b>II.4. PCR en tiempo real</b> .....	7
<b>II.5. Estudio histopatológico e inmunohistoquímico</b> .....	9
<b>II.6. Extracción de proteínas y Western / Dot Blot</b> .....	10
<b>III. RESULTADOS Y DISCUSION</b> .....	11
<b>III.1. Lesiones relacionadas con scrapie</b> .....	11
<b>III.2. Identificación de genes diferencialmente expresados en la médula oblongada de ovino infectado con scrapie natural en fase preclínica</b> .....	13
<b>III.4. Perfil de expresión génica y proteico de seis potenciales biomarcadores asociados con scrapie en SNC durante la fase clínica y preclínica la enfermedad</b> .....	25
III.4.1. COL1A2 y COL3A1 .....	26
III.4.2. GALA1 .....	28
III.4.3. CAPN6 .....	29
III.4.4. MTNR1B.....	30
III.4.5. MT 1 Y 2 .....	31
<b>IV. CONCLUSIONES</b> .....	32
<b>V. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	33
<b>INDICE</b> .....	38