



**Universidad**  
Zaragoza

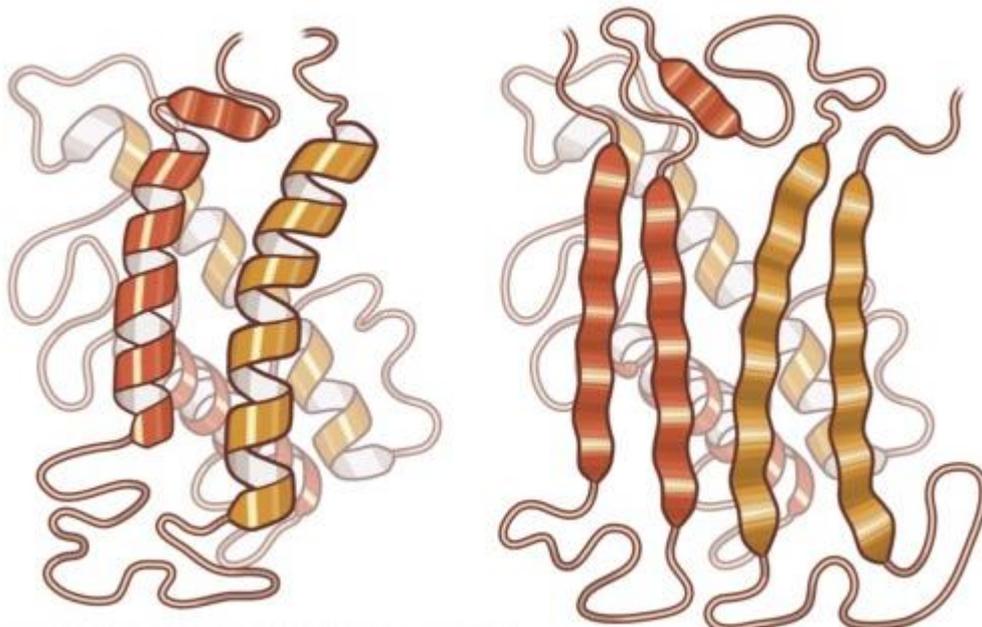


**Facultad de Ciencias**  
**Universidad Zaragoza**

# Alteraciones de microRNAs en modelos murinos de enfermedades priónicas

---

Trabajo de Fin de Grado



**Autor** - Jorge Alejo

**Directores** - Janne M. Toivonen e Inmaculada Martín Burriel

Laboratorio de Genética Bioquímica - Facultad de Veterinaria – Curso 2016/2017



## Agradecimientos

Antes de empezar, me gustaría resumir en unas líneas la gratitud a todas las personas que han estado presentes durante la realización de mi Trabajo de Fin de Grado.

En primer lugar, quiero agradecer a mis dos directores, Janne e Inma, todo lo que me han enseñado y me han transmitido durante estos meses. Gracias por estar dispuestos a ayudarme, a aconsejarme y a dedicarme vuestro tiempo y conocimiento en todo momento. Gracias por estar ahí cuando lo he necesitado, por vuestra colaboración y por abrirme las puertas a un campo de la investigación que desconocía. De verdad, he aprendido mucho de vosotros.

También me gustaría dar las gracias a todos los demás compañeros del grupo de investigación, en especial a Alicia y a Óscar por el tiempo que me han dedicado y por todo lo que me han enseñado y ayudado.

Por último y no por ello menos importante, querría agradecer a mi familia – en especial a mi madre – por preguntarme cada día que tal iba el trabajo, por dedicarme su tiempo, por mostrar un apoyo incondicional de cara a la realización del mismo y por haberme animado a seguir y a darlo todo día tras día durante esta etapa, la cual va llegando a su fin. Finalmente, me gustaría dar las gracias a mis amigos que siempre han tenido una palabra de ánimo para que este trabajo saliera adelante y para sacarme una sonrisa cuando llegaban los momentos de estrés.

A todos ellos, muchas gracias por haber formado parte de este trabajo.



# Índice

<b>1. Resumen/Abstract .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Introducción.....</b>	<b>2</b>
2.1. Encefalopatías espongiformes transmisibles .....	2
2.1.1. Características generales de las EET .....	2
2.1.2. Presencia de EET en diferentes especies .....	2
2.1.3. El agente causal de las EET .....	3
2.1.3.1. La proteína prión celular (PrP <sup>c</sup> ) y la proteína prión patológica (PrP <sup>Sc</sup> ) .....	3
2.1.3.2. Formas de adquisición de la PrP <sup>Sc</sup> .....	4
2.1.4. EET en ovino. El scrapie .....	4
2.1.4.1. Susceptibilidad genética a la enfermedad de scrapie .....	4
2.1.4.2. Diagnóstico clínico.....	5
2.1.4.2.1. Búsqueda de nuevos métodos de diagnóstico: biomarcadores .....	5
2.2. microRNAs.....	6
2.2.1. Biogénesis de los miRNAs.....	6
2.2.2. Funciones de los miRNAs .....	7
2.2.3. Distribución corporal de los miRNAs .....	7
2.2.4. miRNAs como biomarcadores para el diagnóstico de enfermedades priónicas.....	7
<b>3. Antecedentes y Objetivos.....</b>	<b>8</b>
<b>4. Materiales y métodos .....</b>	<b>9</b>
4.1. Muestras utilizadas .....	9
4.2. Análisis de la expresión de miRNAs de interés en muestras de MEC .....	9
4.2.1. Elección de miRNAs y búsqueda en miRBase.....	9
4.2.2. Extracción de RNA.....	10
4.2.3. Determinación de la concentración de RNA .....	11

4.2.4. Retrotranscripción .....	11
4.2.5. PCR cuantitativa (qPCR).....	11
4.2.6. Cuantificación y análisis estadístico.....	11
4.3. Estudio histopatológico .....	12
4.3.1. Valoración de la lesión esponjiforme mediante tinción con hematoxilina-eosina (H-E).....	12
4.3.2. Valoración del depósito de PrP <sup>Sc</sup> mediante PET Blot.....	12
4.3.3. Análisis de los resultados obtenidos en el estudio histopatológico .....	13
<b>5. Resultados y discusión .....</b>	<b>14</b>
5.1. Expresión de miRNAs en el modelo murino Tg501. Cuantificación y análisis...14	
5.2. Expresión de miRNAs en el modelo murino Tg338. ....	15
5.2.1. Determinación de la concentración de RNA .....	15
5.2.2. Cuantificación de miRNAs y análisis estadístico.....	15
5.3. Discusión global de la cuantificación de miRNAs en ratones Tg501 y Tg338... 16	
5.4. Estudio histopatológico .....	17
5.4.1. Valoración de la lesión esponjiforme mediante tinción H-E.....	17
5.4.2. Valoración del depósito de PrP <sup>Sc</sup> mediante PET Blot .....	19
5.5. Discusión global del estudio.....	22
<b>6. Conclusiones .....</b>	<b>23</b>
<b>7. Bibliografía .....</b>	<b>24</b>
<b>8. Anexos .....</b>	<b>26</b>

## **1. Resumen / Abstract**

Las enfermedades espongiformes transmisibles (EET) o enfermedades priónicas constituyen un grupo de enfermedades neurodegenerativas caracterizadas por una degeneración progresiva de tipo espongiforme las cuáles vienen acompañadas de un cuadro clínico que cursa con síntomas nerviosos que pueden conllevar la muerte del individuo y están causadas por unos agentes infecciosos denominados priones. Estudios recientes han demostrado que los miRNAs pueden utilizarse como potentes biomarcadores para el diagnóstico claro, rápido y eficaz de estas enfermedades evitando con ello su transmisión, ya que su expresión se ve alterada en la patología. En este trabajo se analizaron los cambios en la expresión mediante PCR cuantitativa (RT-qPCR) de una batería de miRNAs – cuyo cambio en la expresión se había identificado previamente por la técnica RNAseq - en médula espinal cervical (MEC) de ratones Tg501 y se analizó si estos cambios se repetían en el modelo murino Tg338. Además, se quiso analizar la posible correlación existente entre los niveles de expresión de los miRNAs elegidos y las lesiones histopatológicas de scrapie en estos últimos ratones, valorando el grado de espongiosis y el de depósito de proteína prion patológica PrP<sup>Sc</sup>. Para los ratones Tg501 se confirmó una disminución en la expresión de dos miRNAs, - miR-342-3p y miR-223-3p – en animales infectados por scrapie. Sin embargo, en los ratones Tg338 tan sólo hubo un cambio significativo, la expresión del miR-667-3p era menor en los animales inoculados. No se observó correlación entre la expresión de estos miRNAs y las lesiones histopatológicas, lo que nos lleva a pensar que los miRNAs que han sido elegidos no tienen que ver con el con las lesiones típicas del scrapie pero sí que podrían estar involucrados en otros procesos biológicos como la neuroinflamación, la gliosis o la pérdida neuronal. Por tanto, en este estudio hemos determinado 3 miRNAs que presentan diferencias significativas, aunque dependientes del modelo murino, en su expresión. Sería necesario realizar más estudios para ver si podrían ser utilizados como posibles biomarcadores de la patología del scrapie.

Transmissible spongiform diseases (TSEs), or prion diseases, are a group of neurodegenerative diseases characterized by progressive spongiform degeneration. A clinical frame of TSEs includes nervous symptoms that ultimately lead to the death of affected individual. TSEs are caused by infectious agents called prions. Recent studies have shown that altered miRNAs in prion diseases may be potentially used as biomarkers for rapid and effective diagnosis of these diseases, thus reducing their transmission. In this study, by using quantitative PCR (qPCR), we analyzed the expression of a selected battery of miRNAs previously shown altered by RNAseq in cervical spinal cord (MEC) of Tg501 mice, a model of TSEs. We then further analyzed if these alterations were present in another murine TSE model, Tg338. In addition, we investigated correlation between the expression levels of the selected miRNAs and the histopathological scrapie lesions in Tg338 mice, assessing the degree of spongiosis and the deposition of prion protein PrP<sup>Sc</sup>. In the case of the Tg501 mice a decrease in the expression of two miRNAs, - miR-342-3p and miR-223-3p - in animals infected by scrapie was confirmed. However, in the Tg338 model, there was only a significant change, the expression of miR-667-3p was lower in the inoculated animals. No correlation was observed between the expression of these miRNAs and histopathological lesions, suggesting that the studied miRNAs are not directly linked to these scrapie lesions and could be involved in other biological processes such as neuroinflammation, gliosis or neuronal loss. In conclusion, we have determined three miRNA that present significant, although model-specific, differences in their expression. Further studies are required to investigate if these could be used as possible biomarkers of scrapie pathology.

## **2. Introducción**

### **2.1. Las encefalopatías espongiformes transmisibles**

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) o enfermedades priónicas pertenecen a un grupo de enfermedades neurodegenerativas que afectan al sistema nervioso de humanos y al de diversas especies de animales domésticos y salvajes. Están caracterizadas por una degeneración progresiva de tipo espongiforme y vienen acompañadas de un cuadro clínico que cursa con síntomas nerviosos que pueden conllevar a la muerte del individuo (Geschwind, 2015). A diferencia de otras enfermedades, que están ocasionadas por microorganismos, las enfermedades espongiformes transmisibles están causadas por unos agentes infecciosos no convencionales denominados priones, de ahí su nombre (Aguzzi and Heikenwalder, 2006).

La progresión de la enfermedad se asocia a la conversión de una proteína priónica normal (PrP<sup>C</sup>, *celular prion protein*) codificada por el gen *PRNP*, altamente -aunque no únicamente- expresado en el sistema nervioso central (con mayor incidencia en el hipocampo) en una isoforma anómala asociada a la patogenicidad (PrP<sup>Sc</sup>, *scrapie prion protein*). Dicha transformación se caracteriza por la deposición de la proteína priónica resistente en el tejido nervioso del organismo hasta que finalmente lo acaba dañando, causando la hipertrofia e hiperplasia de los astrocitos y provocando la aparición de cambios degenerativos espongiformes y una fuerte vacuolización en las células del sistema nervioso que desemboca en muerte neuronal (Victoria et al., 2016).

#### **2.1.1. Características generales de las EET**

Este grupo de enfermedades presenta una serie de características (Geschwind, 2015):

- Están causadas por agentes no convencionales denominados priones, extraordinariamente resistentes a procesos de inactivación tanto físicos como químicos, que pasan desapercibidos por el sistema inmunitario
- Tienen una etiología variada, pueden originarse esporádicamente o tener un componente genético determinante. Normalmente se transmiten a través de alimentos o productos médicos contaminados por priones.
- Presentan largos y variados periodos de incubación, dependientes del huésped, de la cepa o de la vía por la que se han transmitido
- El cuadro lesional resultante se caracteriza por una vacuolización espongiforme principalmente ubicada en el pericarion de las neuronas y en el neuropilo de la sustancia gris.
- Tienen una prevalencia baja en la población y son enfermedades incurables debido a la falta de tratamiento específico o vacuna que pudiera prevenirlas
- Son enfermedades fatales que provocan la muerte del individuo

#### **2.1.2. Presencia de EET en diferentes especies**

Las EET se dan en diferentes especies de animales, tanto domésticas como silvestres. Algunas se conocen desde hace mucho tiempo como el scrapie ovino o caprino y la encefalopatía espongiforme bovina (BSE, *bovine spongiform encephalopathy*), la cual es zoonótica, es decir, se transmite al hombre.

Otros ejemplos que afectan a otras especies, aunque con menor incidencia, son la encefalitis transmisible del visón (TME, *transmissible mink encephalopathy*), la encefalopatía espongiiforme felina (FSE, *feline spongiform encephalopathy*) o la caquexia crónica del ciervo (CWD, *chronic wasting disease*). Si acudimos a la especie humana, podemos destacar varias enfermedades pertenecientes a este grupo: la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD, *Creutzfeldt-Jakob disease*), el síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheincker (GSS, *Gerstmann-Straussler-Scheincker disease*), el insomnio familiar fatal (FFI, *fatal familial insomnia*) o la enfermedad del kurú (Imran and Mahmood, 2011).

### 2.1.3. El agente causal de las encefalopatías espongiiformes transmisibles

Las primeras investigaciones centradas en las enfermedades priónicas dedujeron que el agente que las causaba era un virus, concretamente un lentivirus, debido al largo periodo de incubación que presentaban todas ellas (McKintosh et al., 2003). Sin embargo, al analizar las propiedades de estos agentes no convencionales invisibles al microscopio óptico, se atisbó su fuerte resistencia a ser inactivados por tratamientos físicos y la carencia de cuerpos de inclusión y material genético por lo que se postularon diversas hipótesis acerca de su origen molecular (Chianini et al., 2013).

En 1982, el neurólogo y bioquímico estadounidense Stanley Prusiner causó una verdadera revolución al formular la hipótesis del prion, que sostiene que el agente infeccioso responsable de las enfermedades degenerativas en el sistema nervioso central en animales y en la especie humana es una proteína denominada PrP<sup>c</sup> que se acumula en los tejidos y sufre una modificación postraducciona que la convierte en su isoforma asociada a la patogenicidad, PrP<sup>Sc</sup> (Vogel, 1997).

#### 2.1.3.1. La proteína prion celular (PrP<sup>c</sup>) y la proteína prion patológica (PrP<sup>Sc</sup>)

La proteína prion celular está codificada por el gen *PRNP*, un gen autosómico localizado en el brazo corto del cromosoma 20 en la especie humana y expresada mayoritariamente en tejido neuronal, cardíaco, muscular, pancreático y hepático. Se trata de una glicoproteína monomérica de 33 kD sintetizada en el retículo endoplásmico rugoso, con una estructura compacta formada por cuatro hélices alfa y oligosacáridos complejos. Se localiza fundamentalmente anclada a la membrana neuronal y es susceptible a la acción de proteasas. (Westergard, Christensen and Harris, 2007)

Por otro lado, la proteína prion patológica, también codificada por el gen *PRNP*, fue aislada por primera vez de cerebros de hámster afectados por scrapie, de ahí su nomenclatura (PrP<sup>Sc</sup>) Es una proteína de peso molecular de 27-30 kDa que forma agregados amiloides y presenta numerosas láminas beta en su estructura (Wang, Wang and Gao, 2015). La diferencia principal es que ésta sí es resistente a la digestión por proteinasa K.

Estas dos formas PrP<sup>c</sup> y PrP<sup>Sc</sup> comparten la misma secuencia de aminoácidos (estructura primaria); demostrando así la imposibilidad de que fueran productos de dos tipos de mRNA distintos. La diferencia entre ambas reside en su estructura secundaria y terciaria, es decir, en su conformación espacial. La forma PrP<sup>Sc</sup> ha sufrido un plegamiento respecto la forma celular PrP<sup>c</sup>, esto es lo que la hace ser patológica. La conversión de la proteína priónica celular a la forma patológica se produce por una modificación postraducciona que genera esta segunda forma aberrante e induce la transformación de las proteínas prion celulares de su alrededor, provocando además una acumulación en el tejido nervioso que desemboca en muerte neuronal (Eghiaian et al., 2004).

### 2.1.3.2. Formas de adquisición de la PrP<sup>Sc</sup>

Este grupo de enfermedades priónicas puede tener causa hereditaria, surgir de forma esporádica por un cambio conformacional espontáneo de la proteína o incluso tener un origen infeccioso.

Aunque se puede producir transmisión iatrogénica, lo más habitual es que la forma de adquisición sea a través de la ingesta de alimentos contaminados por PrP<sup>Sc</sup>. El éxito de la infección depende de varios factores, entre ellos la cantidad de PrP<sup>Sc</sup> que accede al organismo por contagio, la cantidad de PrP<sup>c</sup> que existe en el tejido, la vía de infección, la susceptibilidad genética y la barrera de especie (Gough and Maddison, 2010).

### 2.1.4. EET en ovino. El scrapie.

El scrapie o tembladera afecta al ganado ovino y en menor medida, al caprino. Pertenece al grupo de las encefalopatías espongiiformes transmisibles y ha sido una de las más estudiadas hasta el momento (Hunter, 2007).

El período de incubación es generalmente de 2 a 5 años en el ganado ovino y son poco frecuentes los casos en ovejas de menos de un año de edad (Hunter, 2007). En la especie caprina se dan casos de scrapie en individuos de entre 2 y 8 años de edad (Curcio et al., 2016). El período de incubación en cabras infectadas de manera experimental es menor a tres años, con un margen que oscila entre 30 y 146 semanas.

Los síntomas de scrapie son variables en el ganado ovino y muchas veces dependen de la cepa del prion y el genotipo o la raza de la oveja (Andreoletti O, 2004). Por lo general, los primeros síntomas están relacionados con el comportamiento: las ovejas afectadas tienden a alejarse del rebaño y pueden rezagarse o ir adelante cuando se arrea el rebaño. A medida que la enfermedad se agrava, los animales manifiestan hiperexcitación, alteraciones locomotoras (tienen un modo de andar inusual que incluyen pasos rápidos y saltos), además de mirada fija con la cabeza bien alta. Otros síntomas pueden incluir ataxia, falta de coordinación, ceguera, temblores o convulsiones cuando se tiene contacto con ellos. Es frecuente un prurito intenso, lo que puede llevar a que el animal frote, raspe o mordisquee su cuerpo. Esto se evidencia fundamentalmente en la pérdida de la lana (Foster et al., 2001)

La mayoría de los animales mueren entre dos a seis semanas tras la manifestación de los primeros síntomas, aunque pueden ocurrir muertes hasta seis meses más tarde (Hunter, 2007).

#### 2.1.4.1. Susceptibilidad genética a la enfermedad de scrapie

En los ovinos, la transmisión y el desarrollo de la enfermedad clínica dependen del genotipo del hospedador. La susceptibilidad o la resistencia a la forma clásica de scrapie están relacionadas con los polimorfismos en el gen *PRNP* en los codones 136, 154 y 171 (Murayama et al., 2012). Estos tres codones se encuentran en una parte de la proteína que puede sufrir cambios estructurales durante la conversión de PrP<sup>c</sup> a PrP<sup>Sc</sup>.

En el codón 136, la alanina (A) está vinculada con la resistencia al scrapie y la valina (V) está asociada con la susceptibilidad. En el codón 154, la histidina (H) está vinculada con la resistencia y la arginina (R) está asociada con la susceptibilidad. Por último, en el codón 171 la arginina (R) está vinculada con la resistencia, mientras que la glutamina (Q) e histidina (H) están asociadas con la susceptibilidad. Aunque otras combinaciones son posibles desde un punto de vista teórico, sólo cinco haplotipos PrP son frecuentes en ovejas: A<sub>136</sub>R<sub>154</sub>R<sub>171</sub> (abreviado ARR), ARQ, AHQ, ARH y VRQ.

Las ovejas con genotipos ARR/ARR son sumamente resistentes a la forma clásica de scrapie, mientras que las ovejas con genotipos VRQ/VRQ son las más susceptibles. Los genotipos restantes presentan una susceptibilidad intermedia a la enfermedad (Baylis and Goldmann, 2004).

Las diferencias en la susceptibilidad genética a padecer scrapie de las ovejas con distintos genotipos se ha tenido en cuenta a la hora de desarrollar modelos murinos para el estudio de estas patologías. Por ejemplo, el ratón transgénico Tg338 (Le Dur et al., 2005) sobreexpresa la PrP<sup>c</sup> ovina con genotipo altamente susceptible (VRQ/VRQ) y el ratón Tg501 (Baylis and Goldmann, 2004) sobreexpresa la misma proteína, en este caso caprina, con genotipo ARQ/ARQ (la secuencia de amino ácidos es igual a la del ovino con este genotipo).

Además de esta susceptibilidad genética, el scrapie es una enfermedad infecciosa por lo que, para desencadenar el desarrollo de la patología, es necesaria la exposición a la proteína priónica patológica.

#### **2.1.4.2. Diagnóstico clínico**

Las encefalopatías espongiformes contagiosas se han diagnosticado tradicionalmente mediante histopatología. Por lo general, el scrapie se confirma mediante la detección de PrP<sup>Sc</sup> en el sistema nervioso central. La vacuolización neuronal y la acumulación de PrP<sup>Sc</sup> ocurren generalmente en el tronco del encéfalo, a nivel del óxex, en ovinos que sufren la forma clásica de scrapie (Hunter, 2007).

La acumulación de PrP<sup>Sc</sup> pueden determinarse en extractos de tejido nervioso no fijado u otros tejidos por inmunotransferencia (Western blotting) y en tejidos fijados, por inmunohistoquímica. El diagnóstico también puede confirmarse al encontrar fibrillas características de PrP<sup>Sc</sup> (fibrillas asociadas al scrapie) mediante microscopía electrónica en extractos cerebrales. Algunas de estas pruebas pueden utilizarse en muestras de tejido cerebral congeladas o autolíticas (Wang, Wang and Gao, 2015). Más recientemente se han desarrollado pruebas rápidas para la detección post mortem de la enfermedad, que incluyen pruebas ELISA.

Las pruebas serológicas no son útiles para realizar el diagnóstico, puesto que no se desarrollan anticuerpos contra el agente de scrapie. En la actualidad, no existe ningún método económico, rápido y eficaz que permita la identificación de individuos en fase preclínica de la enfermedad. El desarrollo de un diagnóstico de este tipo permitiría probablemente la erradicación de la enfermedad de la cabaña ovina y caprina.

##### **2.1.4.2.1. Búsqueda de nuevos métodos de diagnóstico: biomarcadores**

Las herramientas genómicas podrían ayudar a la aclaración de algunos de los mecanismos moleculares de la patología de este grupo de enfermedades, comparando el nivel transcripcional entre individuos sanos y enfermos. Asimismo, podrían permitir la identificación de moléculas útiles para el diagnóstico y dianas terapéuticas en las EETs y otras enfermedades neurodegenerativas. Hasta el momento, los trabajos realizados han detectado una serie de biomarcadores a nivel génico (Parveen et al., 2005). Estos genes codifican proteínas implicadas en el metabolismo lipídico, proteasas, inhibidores de proteasas y chaperonas, entre otras. Sin embargo, los genes que han llegado a confirmarse como biomarcadores específicos para las EETs son muy pocos y además no son suficientemente específicos o sensibles para su uso en test de diagnóstico.

Hay moléculas, como los microRNAs, que se encuentran presentes en los fluidos biológicos de forma estable y cuyos niveles pueden verse alterados por diversas patologías. Estas características los proponen como firmes candidatos a la identificación de biomarcadores para las enfermedades

neurodegenerativas (Basak et al., 2015). Además, se extraen de manera sencilla y se pueden cuantificar fácilmente por PCR cuantitativa en tiempo real. A lo largo de este trabajo vamos a centrarnos en la perturbación de los niveles de estas moléculas en scrapie.

## 2.2. microRNAs

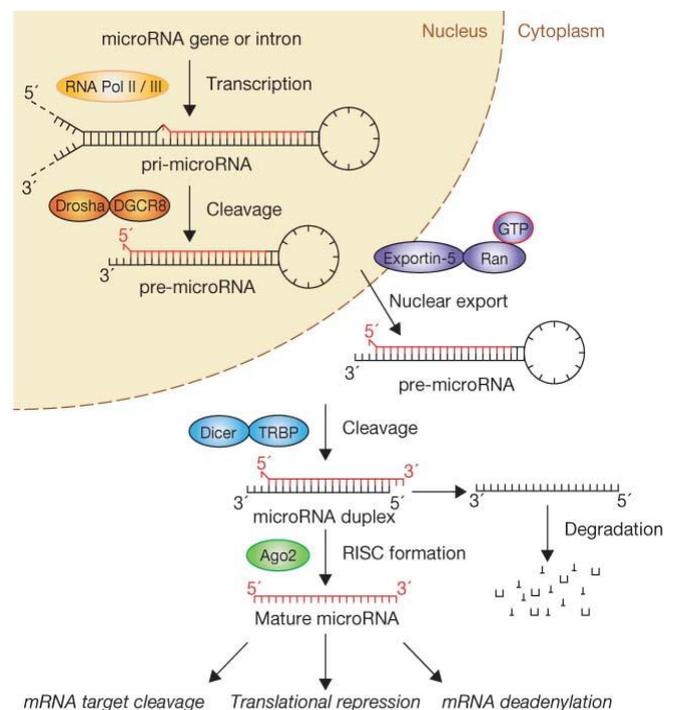
Aunque generalmente se asume que el genoma humano contiene principalmente secuencias codificantes, el proyecto del genoma humano reveló que estas secuencias solo constituyen el 1.5% del genoma completo. El 98.5% restante abarca intrones, secuencias regulatorias de DNA y genes que se transcriben en moléculas no codificantes de RNA (ncRNAs).

Los microRNAs (miRNAs), pertenecientes a este último grupo, son moléculas de RNA muy pequeñas (de 18 a 25 nucleótidos aproximadamente), conservadas evolutivamente, endógenas y no codificantes, que regulan postranscripcionalmente las moléculas de mRNA codificadas por otros genes y que están implicadas en la mayor parte de procesos patológicos y del desarrollo (Mohr and Mott, 2015).

### 2.2.1. Biogénesis de los miRNAs

Los miRNAs se transcriben inicialmente como transcritos primarios o pri-miRNAs con una caperuza en 5' y una cola de poli-adeninas (poli-A) en el extremo 3' y se procesan en el núcleo celular para formar la molécula madura (Ver **Figura 1**). En animales este procesamiento se lleva a cabo gracias a un complejo proteico microprocesador que consta de varias proteínas: la nucleasa Drosha, la RNasa III y una proteína de unión al DNA llamada DGCR8. DGCR8 reconoce la zona de unión entre el RNA de cadena sencilla y el de doble hebra, posicionando la ribonucleasa Drosha a una distancia de 11 nucleótidos desde la zona de unión para que ésta corte en un sitio específico a la molécula de RNA (Bhat, Jarmolowski and Szweykowska-Kulińska, 2016)

Una vez conseguido el pre-miRNA, la proteína exportina 5 la reconoce y la transporta hasta el citosol para un posterior procesamiento dependiente de GTP que transforma el pre-miRNA en un dúplex maduro de miRNA. De todo esto se encarga un complejo formado por Dicer y por una serie de proteínas con un dominio de unión al RNA de doble hebra: TRBP, PACT y Ago2. Dicer corta la horquilla (*stem-loop*) y se genera un dúplex miRNA. Cada una de las hebras puede dar lugar a una forma madura, llamadas en función de la cercanía a cada extremo del pri-miRNA: miRNA-5p o miRNA-3p. Lo más habitual, es que solo una de las hebras se integre en el complejo RISC (la cadena *antisense*). Esta hebra se conoce como hebra guía, que es seleccionada por la proteína Argonauta (una RNasa catalíticamente activa en el complejo RISC) y constituye el mRNA funcionalmente activo. La otra hebra (*sense*), conocida como hebra pasajera, es degradada.



**Figura 1.** Biogénesis de los miRNAs. (Bhat, Jarmolowski and Szweykowska-Kulińska, 2016)

### 2.2.2. Funciones de los miRNAs

Después de su integración en el complejo RISC, los miRNAs se unen por complementariedad de bases a la región 3'UTR de la molécula diana, es decir, el mRNA complementario, donde regulan postranscripcionalmente la expresión génica mediante un mecanismo de represión o silenciamiento génico. Lo pueden llevar a cabo por medio de numerosos mecanismos, entre ellos (Fabian and Sonenberg, 2012):

- Inhibición de alguna fase de la traducción
- Terminación prematura de la traducción
- Degradación de mRNAs diana

No obstante, estudios recientes han puesto de manifiesto la posibilidad de que estas moléculas de miRNAs sean capaces de activar la expresión de ciertos genes, activando así la síntesis proteica (Truesdell et al., 2012). Sin embargo, no hay un gran número de evidencias claras con respecto a esto.

Además, los miRNAs tienen diferentes funciones regulatorias a nivel del desarrollo y proliferación celular en diferentes organismos. De igual forma, estas moléculas median diferentes procesos en tumorigénesis, como inflamación, regulación del ciclo celular, respuesta a estrés, diferenciación, apoptosis e invasión (Schetter, Heegaard and Harris, 2009).

### 2.2.3. Distribución corporal de los miRNAs

Algunos miRNAs son ubicuos mientras que otros se localizan o se expresan de forma específica en un tejido concreto, donde llevan a cabo su función. Recientemente se ha descubierto que los miRNAs no solo se encuentran en el interior celular sino que también están presentes en diversos fluidos corporales, como la sangre, el líquido cefalorraquídeo o la orina (Mall et al., 2013). Es bien conocido que estos miRNAs son muy estables en el medio extracelular a la acción de las ribonucleasas presentes en suero o plasma por lo que se ha pensado que los miRNAs circulantes van envasados en exosomas, microvesículas o cuerpos apoptóticos o forman complejos con lipoproteínas, protegiéndose así de la degradación (Mohr and Mott, 2015).

### 2.2.4. miRNAs como biomarcadores para el diagnóstico de enfermedades priónicas

El descubrimiento reciente de miRNAs ha supuesto un avance y una herramienta importante para el diagnóstico y la prognosis de muchas enfermedades. Muchos miRNAs están implicados en la diferenciación y supervivencia neuronal, en la neurogénesis o en la formación sináptica. El papel de estas moléculas en el cerebro es muy relevante, tanto que cambios en los perfiles de expresión de los miRNAs pueden conducir a un desarrollo neuronal inapropiado desembocando en la muerte de las neuronas - una característica de las enfermedades priónicas (Cheng L et al., 2013)

En el caso de la especie humana se observan alteraciones en miR-128-3p, miR-146a-5p, miR-342-5p y miR-342-3p asociadas a neurodegeneración, más concretamente, en la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob o en el síndrome de Gestmann-Straussler-Scheinker se detectan altos niveles de miR-146a. (Basak et al., 2015). Los últimos estudios basados en enfermedades priónicas humanas han demostrado que la sobreexpresión del miR-146a contribuye a la neurodegeneración progresiva, al igual que el miR-342-5p, proponiéndolo como posible biomarcador no invasivo para la monitorización de estas patologías (Boese et al., 2016).

Son muy pocos los estudios que han analizado cómo la expresión de los miRNAs está afectada en el scrapie. En la especie ovina, el grupo LAGENBIO, en el que he realizado este TFG, llevó a cabo el estudio de la expresión en sistema nervioso central y plasma circulante de una batería de miRNAs cuya expresión había variado en otras enfermedades priónicas (Sanz Rubio D et al., 2017). Este trabajo puso de manifiesto la presencia de dos miRNAs, miR-342-3p y miR-21-5p, que están alterados en el plasma sanguíneo de ovejas infectadas por scrapie. Se vio un aumento, cerca de ser significativo, del miR-21-5p en el sistema nervioso central ovino con scrapie. Este miRNA no se había asociado previamente a las enfermedades priónicas pero ha resultado ser un mediador clave en la respuesta antiinflamatoria. Por esta razón, podríamos decir que este miRNA podría ser buen candidato para su uso como biomarcador de la enfermedad, aunque serían necesarios estudios más profundos para demostrar esto.

El uso de modelos murinos de scrapie permite evitar la variabilidad observada en la enfermedad natural. Investigaciones recientes han encontrado alteraciones en un total de 15 miRNAs, entre los cuales cabe mencionar el miR-342-3p, miR-128a, miR-223-3p, miR-146a, miR-369-5p, miR-667-3p, miR-3085-3p, let-7d o let-7b, en ratones C57BL inoculados con scrapie (Hébert and De Strooper, 2009).

Por tanto, resulta de gran interés analizar si estos cambios se repiten en otros modelos y seguir profundizando en las alteraciones de los perfiles de expresión de estas moléculas para que puedan ser utilizadas como biomarcadores, permitiendo con ello un diagnóstico claro, rápido y eficaz de la enfermedad para evitar la transmisión de la misma. Aunque, el tejido cerebral no sería la fuente ideal de biomarcadores porque su análisis, los cambios en este tejido pueden verse reflejados en tejidos más fácilmente accesibles, como la sangre, y supone un buen punto de partida para comenzar los estudios.

El grupo LAGENBIO ha llevado a cabo la secuenciación de RNAs pequeños en sistema nervioso central de ratones Tg501 infectados con scrapie. Los resultados preliminares del equipo han mostrado la variación de la expresión de seis miRNAs en ratones clínicos y de uno en los preclínicos.

En este trabajo validaremos los cambios observados en los niveles de expresión de diversos miRNAs mediante RNAseq en el modelo en el que se realizó el estudio (Tg501) y en ratones Tg338. En ambos casos, se analizarán tejidos provenientes de animales tanto en fase preclínica como en fase clínica, y sus respectivos controles, se discutirán las consecuencias que pueden tener estas alteraciones y se verá cuáles podrían servir como potenciales biomarcadores.

### **3. Antecedentes y objetivos**

El grupo en el que he realizado el TFG está analizando cambios en la expresión de miRNAs en scrapie como fuente de posibles biomarcadores. Los estudios previos realizados en modelos murinos infectados con una cepa de scrapie adaptada al ratón mostraron una batería de miRNAs con expresión diferenciada en las distintas fases de la enfermedad, clínica y preclínica. Estos resultados se obtuvieron a partir de una secuenciación genómica de RNAs pequeños (RNAseq) de la médula espinal cervical de los ratones Tg501. El objetivo general de este trabajo será validar los cambios observados mediante RNAseq y estudiar su relación con las lesiones propias de las enfermedades priónicas. Los objetivos específicos de este TFG son:

- Seleccionar entre los resultados de RNAseq una batería de miRNAs cuya expresión se haya visto alterada.

- Cuantificar la expresión de estos miRNAs mediante RT-qPCR en las muestras de Tg501 en las que se realizó RNAseq.
- Comprobar si los cambios de dan en un modelo distinto de enfermedad priónica (ratones transgénicos Tg338).
- Comparar si existe relación entre los niveles de expresión de los miRNAs elegidos y las lesiones histopatológicas de scrapie.

## **4. Materiales y métodos**

### **4.1. Muestras utilizadas**

En este trabajo hemos utilizado muestras de dos modelos animales Tg501 y Tg338 cuyas características se muestran en las **Tablas A1 y A2** de los **Anexos**. Nuestro estudio se centró en el sistema nervioso central de los ratones, concretamente en la región de médula espinal cervical (MEC), la parte más craneal de la médula espinal próxima a la médula oblongada, siendo ésta última una de las regiones más afectada en la patología del scrapie. Las muestras se obtuvieron de los animales sacrificados del banco de tejidos del Centro de Investigación en Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes (CIEETE) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza.

De los ratones Tg501, el grupo de trabajo obtuvo anteriormente RNA de la MEC para llevar a cabo la cuantificación de la expresión de los miRNAs mediante la secuenciación de RNAs pequeños. Aquí, se validaron los resultados en las muestras de RNA procedentes de los mismos animales Tg501 (12 en fase clínica, 7 inoculados y 5 control; 12 en fase preclínica: 6 inoculados y 6 control) con qPCR. Para el análisis de los miRNAs en Tg338, se obtuvieron muestras de este tejido pertenecientes a 10 ratones en fase clínica (4 inoculados y 6 control) y 10 en fase preclínica (4 inoculados y 6 control). Estas muestras habían sido preservadas en RNAlater® (Sigma) y a -80 °C inmediatamente después del sacrificio del animal.

De los ratones Tg338, también se utilizaron cortes del tejido cerebral conservado en formalina y embebido en parafina para hacer un estudio histopatológico y proceder a la visualización de las lesiones espongiiformes a través de la tinción con hematoxilina-eosina (H-E) y al análisis del depósito de PrP<sup>Sc</sup> en las distintas regiones del cerebro a través de la técnica de PET Blot.

### **4.2. Análisis de la expresión de miRNAs de interés en muestras de médula espinal cervical**

#### **4.2.1. Elección de miRNAs y búsqueda en miRBase**

Tras la secuenciación por RNAseq, se seleccionaron diez miRNAs presentes en el sistema nervioso central de la totalidad que sufrieron alteraciones significativas en sus niveles en ratones Tg501 inoculados con scrapie con respecto a sus controles. Tras la corrección por test múltiple, las muestras clínicas del modelo murino Tg501 mostraban seis alteraciones significativas (valor de  $q < 0.05$ ): miR-146a-5p y let-7b-5p están sobreexpresados mientras que miR-3085-3p, miR-342-3p, miR-667-3p y miR-7046-3p presentaban menores niveles de expresión. Para las muestras preclínicas se observó solo una alteración significativa: miR-223-3p, cuya expresión también era más baja en los ratones inoculados con scrapie. Aparte de estos, se analizaron tres miRNAs que podrían estar implicados –de acuerdo a estudios previos (Sanz-Rubio et al., 2017) y otros trabajos no publicados- en la aparición de enfermedades priónicas, tanto en animales como en humanos.

Estos fueron el miR-21a-5p, miR-301a-3p y miR-331-3p. Todos ellos fueron seleccionados para la qPCR en los ratones clínicos (Tg501 y Tg338) pero únicamente el miR-223-3p fue estudiado en las muestras preclínicas.

Como normalizadores para la qPCR se utilizaron dos miRNAs, el miR-186-5p y el miR-369-5p (el primero para las muestras clínicas y el segundo para las preclínicas), debido a que su expresión permaneció inalterada en los distintos grupos en el estudio previo de RNAseq.

En la **Tabla 1** se recogen los miRNAs elegidos para el estudio de expresión en este trabajo. Para recoger más información acerca de estos miRNAs se acudió a la base de datos especializada miRBase ([www.mirbase.org/](http://www.mirbase.org/)), de donde se obtuvo la secuencia de cada miRNA maduro. También se recurrió a la herramienta miRIAD (<http://bmi.ana.med.uni-muenchen.de/miriad/>) para confirmar que cada uno de los miRNAs estudiados están expresados en el sistema nervioso central.

**Tabla 1:** Batería de miRNAs estudiada en el TFG. Se muestra el número de identificación y nombre del ensayo TaqMan miRNA (ThermoFisher) utilizado, el nombre del miRNA y la secuencia del miRNA maduro del ratón.

ID ensayo	Nombre ensayo	miRNA detectado	Secuencia de miRNA maduro
000468	mmu-miR-146a	<b>miR-146a-5p</b>	UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU
464290_mat	mmu-miR-3085	<b>miR-3085-3p</b>	UCUGGCUGCUAUGGCCCCUC
002260	mmu-miR-342	<b>miR-342-3p</b>	UCUCACACAGAAUCGCACCCGU
001949	mmu-miR-667	<b>miR-667-3p</b>	UGACACCUGCCACCCAGCCCAAG
006346_mat	mmu-miR-301 <sup>a</sup>	<b>miR-301a-3p</b>	CAGUGCAAUAGUAUUGUCAAAAGC
03306756_pri	mmu-let-7b	<b>let-7b-5p</b>	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
480966_mir	mmu-miR-186	<b>miR-186-5p</b>	CAAAGAAUUCUCCUUUUGGGCU
001309	mmu-miR-369	<b>miR-369-5p</b>	AGAUCGACCGUGUUAUAUUCGC
466701_mat	mmu-miR-7046	<b>miR-7046-3p</b>	UGAACCACCCAUCCCCUACAG
000397	mmu-miR-21 <sup>a</sup>	<b>miR-21a-5p</b>	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
481064_mir	mmu-miR-331	<b>miR-331-3p</b>	GCCCCUGGGCCUAUCCUAGAA
481007_mir	mmu-miR-223	<b>miR-223-3p</b>	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA

#### 4.2.2. Extracción de RNA

Previo a la extracción de RNA se limpiaron las superficies con RNaseZap® (Sigma) para eliminar ribonucleasas en el área de trabajo. Inmediatamente después de descongelar las muestras preservadas en RNAlater®, el tejido fue homogeneizado en 500µl de Qiazol (Qiagen), un detergente que provoca la ruptura del tejido con el que estamos trabajando, en el aparato TeSeE Process 48 (Biorad). El resultado de esta homogeneización se centrifugó y se transfirió el contenido de cada uno de los tubos a una serie de eppendorf libres de RNasas. Para el aislamiento del RNA, se recurrió al kit comercial DirectZol (Zymo Research), el cual permitió la extracción y purificación de RNA total incluyendo los RNAs no codificantes. Finalmente, siguiendo las recomendaciones del fabricante, las muestras se trataron con DNasa en la columna para degradar el DNA y el RNA se eluyó con agua sin nucleasas y se conservó en hielo para pasar directamente a determinar su concentración.

### 4.2.3. Determinación de la concentración de RNA.

Tras el aislamiento y la purificación, se llevó a cabo la cuantificación del RNA y se evaluó el grado de pureza acudiendo a los ratios de valores de absorbancia  $A_{260/280}$  y  $Abs_{260/230}$  haciendo uso de NanoDrop 1000 (Thermo Scientific), un espectrofotómetro que mide la absorbancia de volúmenes muy pequeños de muestra. Una vez determinada la concentración, el RNA se almacenó a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso para la retrotranscripción.

### 4.2.4. Retrotranscripción del RNA

El proceso de retrotranscripción se llevó a cabo utilizando TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit con TaqMan®MicroRNA Assays (Life Technologies) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se utilizaron ensayos específicos de cada miRNA para realizar la retrotranscripción a partir de las muestras de RNA. La reacción de retrotranscripción se realizó con los siguientes componentes:  $0,5\text{ }\mu\text{L}$  de cada ensayo TaqMan (tubo RT, 20X),  $1\text{ }\mu\text{L}$  de buffer de retrotranscripción (10X),  $0,1\text{ }\mu\text{L}$  desoxirribonucleótidos (final 1mM),  $0,13\text{ }\mu\text{L}$  de inhibidor de RNasas (total 2,5 U),  $0,7\text{ }\mu\text{L}$  la enzima transcriptasa inversa (total 35 U),  $20\text{ ng}$  de RNA total y agua libre de nucleasas hasta un volumen total de  $10\text{ }\mu\text{L}$ . Tras mezclar y centrifugar los distintos componentes, las muestras se introdujeron en el termociclador 2720 (Applied Biosystems) para someterlas al programa de la retrotranscripción:  $16\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 minutos (min),  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 min,  $85\text{ }^{\circ}\text{C}$  5 min y  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$   $\infty$ .

### 4.2.5. PCR cuantitativa (qPCR)

Las reacciones qPCR se prepararon en una placa de 96 pocillos en un volumen total de  $5\mu\text{L}$ . El experimento se hizo por triplicado para controlar los errores de pipeteo. Para cada muestra y miRNA se utilizaron  $2,5\text{ }\mu\text{L}$  Taqman® Fast Universal Master mix (2X),  $0,25\text{ }\mu\text{L}$  de ensayo TaqMan (tubo TM, 20X), y  $2,25\text{ }\mu\text{L}$  del cDNA diluido previamente 1:7 con agua. Se cubrió la placa con papel de aluminio para proteger la mezcla de la luz hasta que se procesó en el termociclador StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). El programa utilizado en la qPCR fue el siguiente:  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  20 segundos (seg),  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  1 seg y  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  20 seg (40 ciclos para los pasos 2 y 3).

### 4.2.6. Cuantificación y análisis estadístico

El último paso del proceso es llevar a cabo la cuantificación de los miRNAs y hacer un análisis estadístico con el objetivo de ver si los cambios en la expresión de los mismos eran significativos o no. Para realizar la cuantificación se utilizó el método  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  (Livak and Schmittgen, 2001) que calcula la expresión génica como un cambio relativo en dos condiciones distintas, animales sanos (control) y animales enfermos (inoculados).

Como se ha comentado anteriormente, se utilizó como normalizador el valor del ciclo umbral (Ct) de los siguientes miRNAs: el miR-369-5p (en el caso de las muestras clínicas) y el miR-186-5p (en el caso de las muestras preclínicas). Se calculó primero la media del valor de Ct de los triplicados de cada muestra. Comparando esas medias y calculando su diferencia se obtuvo el valor  $\Delta\text{Ct}$  ( $\Delta\text{Ct}=\text{Ct}_{\text{muestra}}-\text{Ct}_{\text{normalizador}}$ ). Una vez conseguido, fue necesario hacer una media del mismo para cada uno de los grupos de animales control e inoculados con scrapie. Con esos dos valores de las medias,  $\Delta\text{Ct}_{\text{control}}$  y  $\Delta\text{Ct}_{\text{infectados}}$  se calculó el valor  $\Delta\Delta\text{Ct}$ , que corresponde con la diferencia entre ambos, siendo igual a cero en el caso de los animales control.

Con la finalidad de transformar el proceso exponencial en una relación lineal se emplea la conversión  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ , utilizando como calibrador el grupo de animales sanos puesto que el valor de  $\Delta\Delta\text{Ct}=0$ , luego

$2^{-\Delta\Delta Ct}=1$ . Con el mismo método, se calculan las barras de error que se han generado utilizando los valores  $2^{-\Delta\Delta Ct+SD}$  y  $2^{-\Delta\Delta Ct-SD}$ , correspondientes a los límites superior e inferior respectivamente, donde SD hace referencia a la desviación estándar.

Una vez obtenidos estos valores, se procedió al análisis de parámetros estadísticos para ver si los cambios en la expresión son significativos. Los parámetros evaluados en primer lugar fueron el test de Shapiro-Wilk para ver si los valores de  $\Delta Ct$  seguían una distribución normal y el test de Levene para analizar la igualdad de varianzas de  $\Delta Ct$  entre los grupos. A continuación, se estudiaron los datos que tenían una distribución normal e igualdad de varianzas entre los distintos grupos utilizando la prueba t-Student. En el caso de aquellos datos que no seguían una distribución normal se recurrió al test de Mann-Whitney.

### 4.3. Estudio histopatológico

El grado de lesión esponjiforme en el tejido y la intensidad de inmunomarcaje de PrP<sup>Sc</sup> se valoró de forma semicuantitativa junto con investigadores del Centro de Investigación en Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes, especialistas en la neuropatología de las enfermedades priónicas. Se valoraron un total de nueve zonas: corteza frontal (CF), corteza talámica (CT), área septal (AS), hipocampo (Hc), tálamo (Tal), hipotálamo (Ht), cóliculo (Col), cerebelo (Cb) y médula oblongada (MO).

#### 4.3.1. Valoración de la lesión esponjiforme mediante tinción con hematoxilina eosina (HE)

Para poder observar y cuantificar las lesiones esponjiformes, así como el fenómeno de vacuolización neuronal - no observables macroscópicamente - presentes en el tejido cerebral de las muestras de los ratones objeto de estudio se realizó una tinción de cortes histológicos con hematoxilina-eosina.

El método supone la aplicación de la tinción de hematoxilina, un compuesto catiónico que tiñe estructuras ácidas (basófilas) como la cromatina nuclear en tonos púrpuras y el uso de eosina que tiñe componentes básicos (acidófilos) como los citoplasmas en todos de color rosa, gracias a su naturaleza aniónica. En el proceso se emplea xilol para eliminar la parafina que hayan podido quedar y alcohol en concentración decreciente con la finalidad de rehidratar la muestra. Finalmente, la muestra se monta en DPX, para su adecuada conservación y correcta visualización al microscopio. El protocolo seguido se muestra en el **Protocolo A3** de los **Anexos**.

#### 4.3.2. Valoración del depósito de PrP<sup>Sc</sup> mediante PET Blot

La técnica PET Blot (*paraffin-embedded tissue blot*) es una herramienta más sensible que la inmunohistoquímica y altamente precisa en estudios de enfermedades priónicas debido a su rápida y eficaz capacidad para llevar a cabo la visualización de la proteína prion patológica (PrP<sup>Sc</sup>). Gracias a la digestión de los cortes tisulares con una alta concentración de proteinasa K (PK) se elimina la proteína prion celular, PrP<sup>c</sup>, que es sensible a la digestión enzimática, para poder determinar únicamente la forma patológica que no lo es. Además, esta técnica permite identificar cómo se distribuye esta proteína en las distintas partes del cerebro de los ratones objetos de estudio.

Esta técnica se utilizó para determinar la distribución tisular de PrP<sup>Sc</sup> en las muestras de encéfalo de los ratones Tg338 inoculados con scrapie. Previamente al desarrollo de la técnica fue necesario efectuar cortes con el microtómo de cada una de las 12 muestras a evaluar (4 cortes de animales en fase preclínica, 4 en fase clínica y 2 controles) y recuperarlos en una membrana de nitrocelulosa de

0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Como el número de muestras a analizar era elevado, fue necesario distribuir las membranas en dos membranas. Ambas membranas se dejaron en la estufa a 37°C hasta su procesado.

Tras el secado en estufa, se colocaron las membranas en una cubeta de 50 ml para llevar a cabo el desparafinado y rehidratado de las membranas de forma similar al protocolo seguido con los cortes del apartado anterior (**Protocolo A4 de Anexos**)

Una vez hecho el desparafinado, se digirió el tejido con proteinasa K (250 $\mu\text{g/ml}$ ) en TBS + Brij 35P al 0,1% durante 2 horas al baño María (55-56 °C), agitando las membranas cada 30 minutos. Este paso es necesario porque la proteinasa K digiere la forma priónica celular pero no la PrP<sup>Sc</sup>, de esta manera se consigue visualizar única y exclusivamente la forma patológica.

A continuación, se procedió a lavar las membranas en TBST (10 mM Tris HCl, pH 7.8, 100 mM NaCl, 0.05% Tween 20) durante diez minutos en agitación rápida. Finalmente se desnaturalizaron las proteínas mediante el tratamiento con tiocianato de guanidinio 3M en TBS durante 10 minutos. Este compuesto es preferible al ácido fórmico porque evita la degradación de las membranas. Tras la desnaturalización, se volvió a lavar tres veces durante 10 minutos en tampón TBST (+Leche desnatada al 1%) en agitación rápida. La leche se utilizó como solución de bloqueo de los sitios no específicos. Después de esto, se procedió a la saturación de las membranas mediante su incubación con tampón de saturación (TBST + Albúmina Sérica Bovina (BSA) al 0,2%), en agitación lenta toda la noche a temperatura ambiente.

Al día siguiente, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario monoclonal de ratón Sha31 (Bertin Pharma, *ref A03213*), diluido 1:8000 en tampón de saturación, durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron de nuevo tres veces en TBST y se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario, un anticuerpo policlonal de cabra anti-ratón (Dako, *ref D0486*) diluido 1:500 en tampón de saturación.

Tras la hibridación de los anticuerpos, se realizaron cinco lavados de 10 minutos con TBST + Leche al 1% en agitación rápida y se ajustó el pH de las membranas a un pH alcalino puesto que el anticuerpo secundario va unido a la enzima fosfatasa alcalina, la cual requiere este pH para su actuación. Para ajustarlo fue necesario lavar las membranas dos veces durante cinco minutos en TBS + 50 mM de MgCl<sub>2</sub> en agitación rápida.

Finalmente, para revelar el marcaje, las membranas se incubaron con el sustrato de la fosfatasa alcalina NBT/BCIP (nitroazul de tetrazoloilo/5-bromo 4-cloro 3-indolil fosfato) durante 40 minutos en agitación rápida. Este compuesto sufre una reacción de tautomerización y oxidación y aporta un tinte de una intensa coloración violeta. La reacción se paró con agua corriente. Para poder analizar los resultados, las membranas se secaron a temperatura ambiente y se protegieron de la oscuridad.

### **4.3.3. Análisis de los resultados obtenidos en el estudio histopatológico**

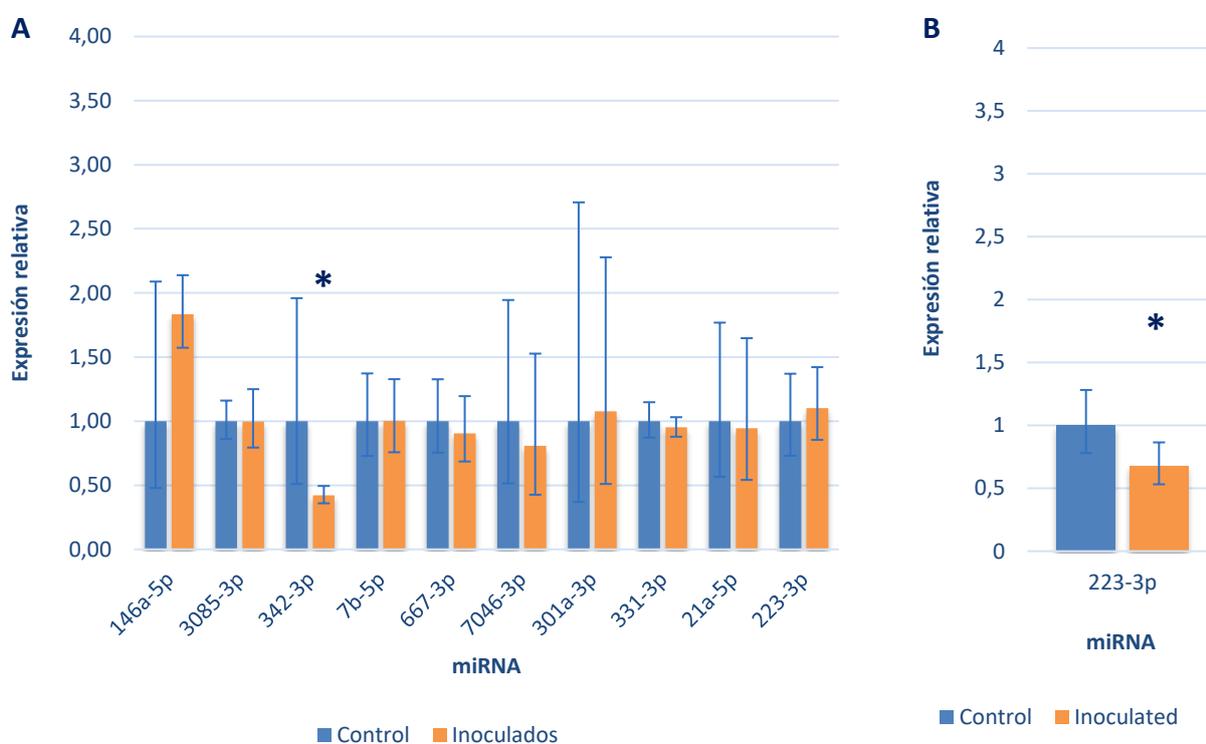
Los cortes histológicos teñidos con HE fueron analizadas en el microscopio óptico ZEISS Axioskop 40 y las membranas de PetBlot con la lupa Stemi DV5. Se evaluó el grado de vacuolización neuronal, de lesiones espongiiformes en el neuropilo, así como el de depósito de PrP<sup>Sc</sup> de forma semicuantitativa en las distintas áreas del encéfalo otorgando valores de 0 a 5 (siendo 0 la ausencia de lesión espongiiforme o inmunoreacción y 5 el mayor grado de vacuolización o intenso inmunomarcaje). Las diferencias histopatológicas entre los grupos objeto de estudio fueron evaluadas utilizando los tests no paramétricos Mann-Whitney (para la comparación entre dos grupos).

## 5. Resultados y discusión

### 5.1. Expresión de microRNAs en el modelo murino Tg501. Cuantificación y análisis estadístico.

Como se ha comentado en el apartado anterior, el grupo de trabajo obtuvo RNA de la médula espinal cervical de los ratones Tg501 para llevar a cabo la cuantificación de la expresión de los miRNAs mediante RNAseq. Por tanto, partimos ya de estos datos y con ellos se procedió a la cuantificación utilizando qPCR.

Los resultados de la expresión relativa en muestras, tanto de animales Tg501 en fase clínica como preclínica, se presentan en la **Figura 2** (véase también **Tablas A5 y A6 de Anexos**).



**Figura 2.** Expresión de miRNAs en el modelo murino Tg501. A) Muestras en fase clínica. B) Muestras en fase preclínica. En el eje X quedan representados cada uno de los miRNAs objeto de estudio y en el eje Y, la expresión relativa ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) de los mismos. Las barras de errores representan valores basados en la desviación estándar (SD), tal y como se ha explicado en “Materiales y métodos”. \* $P < 0.05$ , prueba t de Student.

Tal y como se puede deducir de las **Tablas A7 y A8 de Anexos** y de la **Figura 2A**, en el caso de las muestras en fase clínica se observa un cambio estadísticamente significativo en el miR-342-3p ( $p = 0.0014$ , prueba t de Student), el cuál presenta una menor expresión en los animales infectados con scrapie. El resto de miRNAs no presentan diferencias significativas, aunque el miR-146a-5p muestra cierta tendencia a la sobreexpresión en estos animales inoculados ( $p = 0.074$ , prueba t de Student). Debido a que apenas hay diferencias significativas, únicamente podemos corroborar la alteración de dos de los miRNAs estudiados con la patología del scrapie, tal y como se apuntaba en la bibliografía.

En el caso de las muestras preclínicas (**Figura 2B**), el miR-223-3p presenta una expresión más baja en el caso de los ratones inoculados que en los ratones pertenecientes al grupo control ( $p=0.021$ , prueba t de Student), tal y como se esperaba según RNAseq.

## 5.2. Expresión de microRNAs en el modelo murino Tg338

### 5.2.1. Determinación de la concentración de RNA.

Previo al estudio, se llevó a cabo la cuantificación de los RNA de muestras clínicas de los ratones Tg338 por parte del grupo de investigación (**Tabla A9 de Anexos**).

Para las muestras preclínicas, los datos obtenidos se recogen en la **Tabla A10 de Anexos**. Como se observa, las concentraciones de RNA de todas las muestras estaban comprendidas entre 25 ng/ $\mu$ l y 60 ng/ $\mu$ l, dentro del rango normal considerando la pequeña cantidad de tejido nervioso que se ha utilizado. En general, las muestras de ratones infectados con scrapie (media de 33 ng/ $\mu$ l) presentaban una concentración de RNA menor comparada con las muestras de ratones pertenecientes al grupo control (media de 49 ng/ $\mu$ l). En cualquier caso, estas cantidades eran suficientemente altas para el análisis de las alteraciones de los miRNAs debido a que solo una pequeña cantidad de RNA fue utilizada para la síntesis de cDNA.

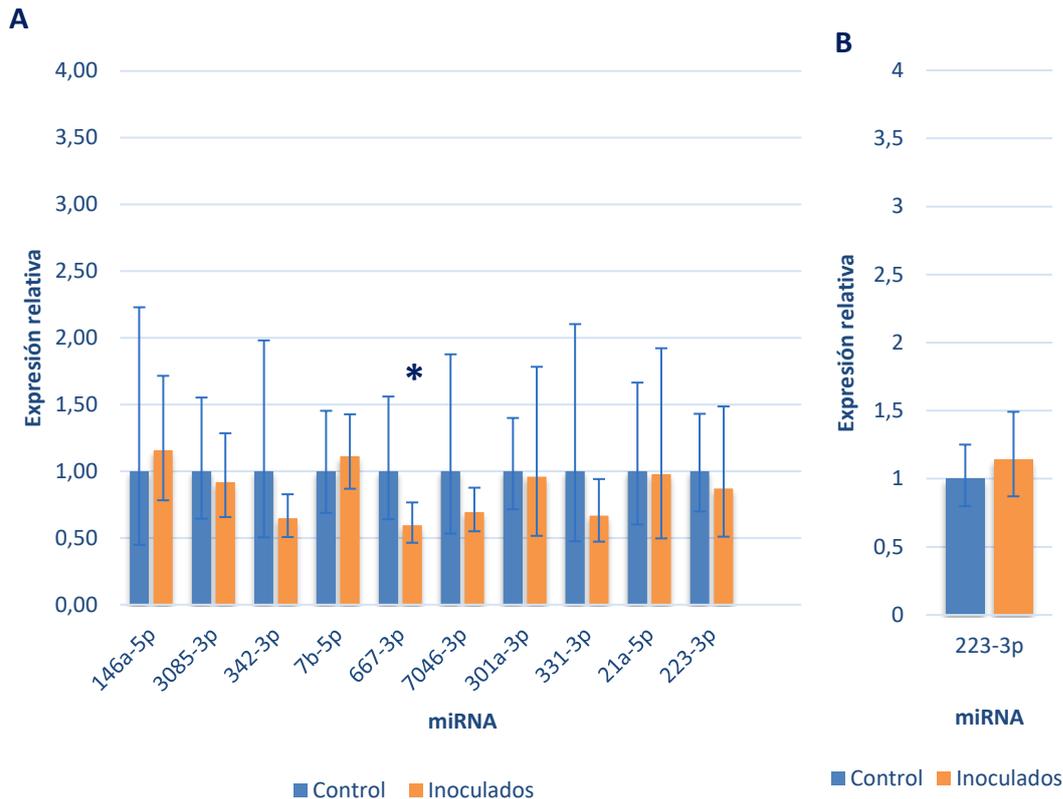
Los ratios  $Abs_{260/280}$  y  $Abs_{260/230}$  miden la pureza del material a analizar, en nuestro caso RNA. El primero,  $Abs_{260/280}$ , mide la contaminación con DNA y proteínas. Cuanto más cercano a 2 sea dicho valor, más puro está. Como se puede apreciar en las muestras preclínicas, las muestras de RNA no contenían cantidades significativas de DNA ni de proteínas.

El ratio  $Abs_{260/230}$  sirve para evaluar la presencia de algunos agentes quelantes como el EDTA o componentes orgánicos como el Qiazol, con el cual trabajamos en el proceso de extracción y purificación. Los valores mayores de 1.8 generalmente aseguran que no hay contaminación significativa. De acuerdo a la **Tabla A10**, casi todos los ratios estaban por encima o cerca de ese valor, lo que nos indica la ausencia de contaminantes orgánicos durante el proceso de extracción de RNA. De todo esto pudimos afirmar que el material del que partimos estaba puro y no presentaba contaminaciones.

### 5.2.2. Cuantificación de miRNAs en muestras de médula espinal cervical y análisis estadístico

Los resultados obtenidos del estudio estadístico utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , llevado a cabo para ver si había cambios en la expresión relativa de los miRNAs objetos de estudio entre grupo control y el grupo inoculado del modelo murino Tg338, se recogen en la **Tabla A11 y A12 de Anexos** y a partir de ellos se construyeron las gráficas de la **Figura 3**.

Igual que en el caso de los ratones Tg338, se hizo un estudio de los parámetros estadísticos (**Tablas A13 y A14 de Anexos**) para ver en qué casos había diferencias significativas.



**Figura 3.** Expresión de miRNAs en el modelo murino Tg338. A) Muestras en fase clínica. B) Muestras en fase preclínica. En el eje X quedan representados cada uno de los miRNAs objeto de estudio y en el eje Y, la expresión relativa ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) de los mismos. Las barras de errores representan valores basados en la desviación estándar (SD), tal y como se ha explicado en “Materiales y métodos”. \* $P < 0.05$ , prueba t de Student.

En las muestras clínicas, **Figura 3A**, tan solo observamos un cambio estadísticamente significativo en el miR-667-3p, cuya expresión era menor en los animales inoculados con scrapie en comparación con los controles ( $p = 0.04$ , prueba t de Student). A diferencia del modelo murino Tg501, en estos ratones no había cambios significativos en el miR-223-3p ( $p = 0.45$ , prueba t de Student) en las muestras en fase preclínica (**Figura 3B**). El resto de miRNAs no presentaban diferencias significativas por lo que con este estudio no podemos corroborar que la expresión de los mismos se vea alterada con la patología del scrapie en este modelo animal.

### 5.3. Discusión global de la cuantificación de miRNAs en ratones Tg501 y Tg338.

Como se ha comentado previamente, los únicos miRNA cuyas expresiones estaban alteradas en los ratones Tg501 eran el miR-342-3p (en muestras en fase clínica) y el miR-223-3p (en muestras en fase preclínica), ambas siendo menores en los animales infectados por scrapie que en los controles. Por el contrario, en el modelo murino Tg338 sólo se observaba un cambio significativo, la expresión del miR-667-3p en las muestras clínicas era menor en animales inoculados. Sin embargo, no había diferencias significativas en la expresión de miRNAs en las muestras preclínicas, como pasaba en los ratones Tg501.

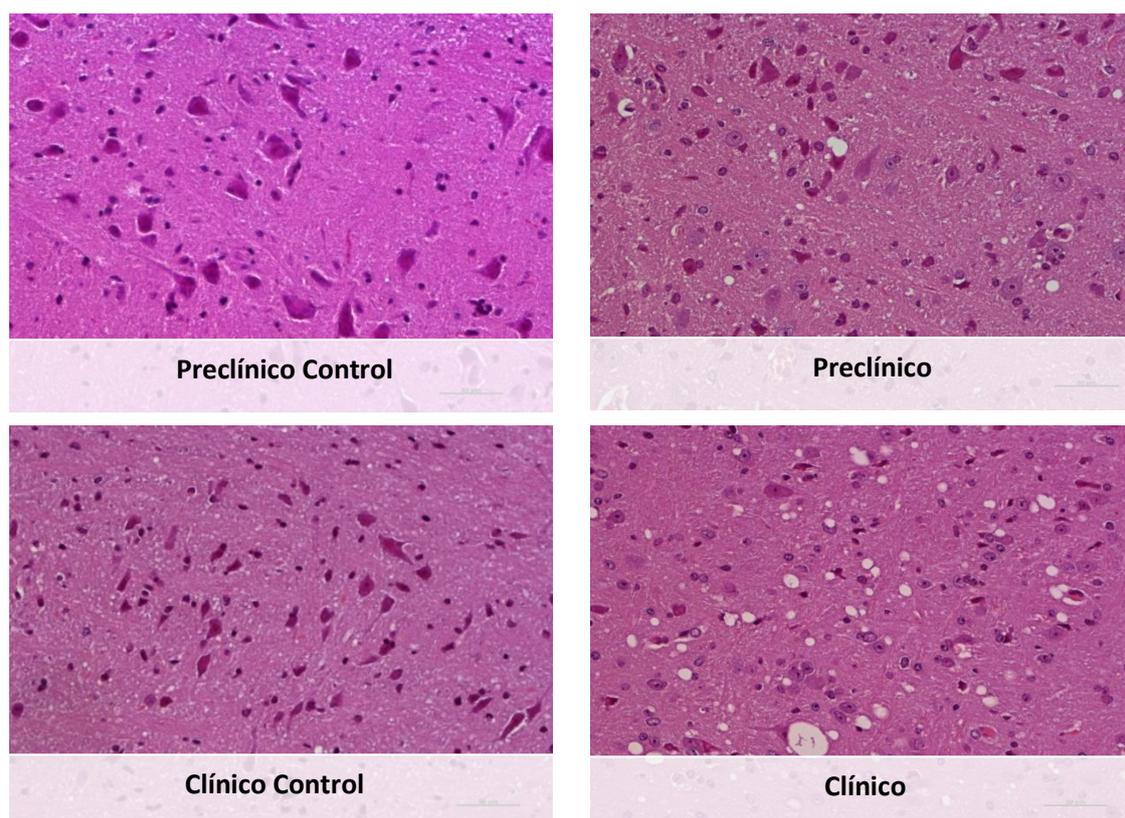
En cuanto al resto de miRNAs analizados, a pesar de que la literatura demuestra su importancia en enfermedades priónicas, en este estudio no se han observado alteraciones significativas en su expresión en los animales enfermos. El grupo LAGENBIO estudió la expresión en sistema nervioso

central y plasma circulante de una batería de miRNAs. Esto puso de manifiesto la presencia de dos miRNAs, miR-342-3p y miR-21-5p, que sufren alteraciones en el plasma sanguíneo de ovejas infectadas por scrapie. Por ejemplo, los cambios observados en la expresión del miR-21-5p (mediador clave de la respuesta antiinflamatoria) están cerca de ser significativos en el scrapie ovino. El miR-342-3p, al igual que el anterior, presenta una expresión mucho mayor en el plasma de las ovejas infectadas. Además, considerando otro ejemplo, el miR-146a, cuya expresión en el tejido cerebral de los ratones inoculados muestra cambios con tendencia a ser significativos en el modelo murino Tg501, siendo mayor en estos animales infectados, está relacionado con el depósito de prion y la modulación de la respuesta inmunitaria innata (Lee, Kim and Jo, 2016). Estudios previos demuestran que este miRNA actúa como marcador en algunas enfermedades priónicas humanas como CDJ o GSS, incrementando su expresión de forma progresiva con el transcurso de la enfermedad (Lukiw et al., 2011).

## 5.4. Estudio histopatológico

### 5.4.1. Valoración de la lesión esponjiforme mediante tinción con hematoxilina eosina

La tinción de las secciones de tejido con hematoxilina-eosina y su posterior visualización al microscopio óptico permitió observar las lesiones esponjiformes. La **Figura 4** muestra una imagen representativa de la esponjiosis observada.

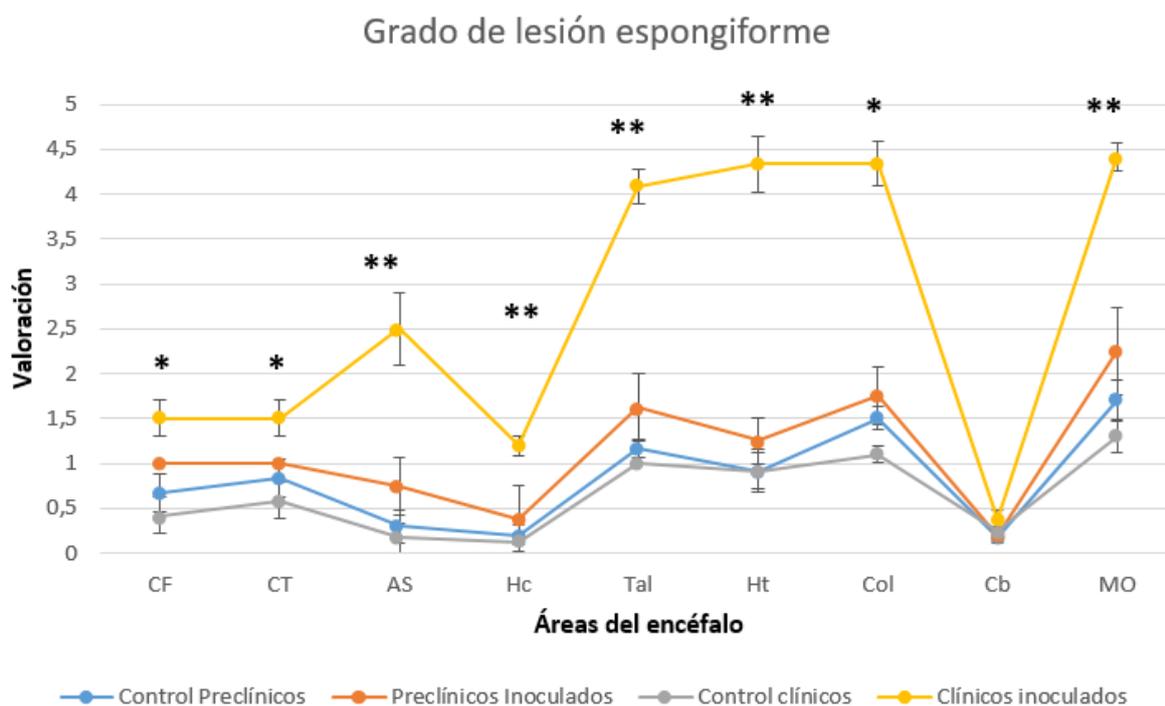


**Figura 4:** Cortes histológicas de la médula oblongada teñidos con hematoxilina-eosina y representativos de los ratones inoculados con scrapie en fase preclínica y clínica y sus respectivos controles.

Las muestras de animales inoculados con scrapie en fase clínica presentaban un alto grado de vacuolización y espongirosis. En el caso de las muestras pertenecientes al grupo de ratones inoculados con scrapie en fase preclínica también se observa espongirosis pero en menor medida.

Para establecer si el grado de lesión mostraba diferencias significativas entre los distintos grupos, se valoró de forma semicuantitativa (de 0 a 5) el grado de vacuolización y de lesión espongirosa de los cortes histológicos. Los valores de cada área se presentan en la **Tabla A15** de **Anexos**.

La **Figura 5** muestra el perfil lesional en las distintas áreas del encéfalo.



**Figura 5:** Perfil lesional con la valoración semicuantitativa del grado de espongirosis en las áreas del encéfalo de los distintos grupos de ratones Tg338. Cada punto corresponde con el valor medio del grupo ( $\pm$  error estándar). Áreas analizadas: corteza frontal (CF), área septal (AS), corteza talámica (CT), hipocampo (Hc), tálamo (Tal), hipotálamo (Ht), cóliculo (Col), cerebelo (Cb) y médula oblongada (MO). Las diferencias significativas fueron determinadas comparando cada grupo de animales inoculados con sus respectivos controles utilizando el test estadístico de Mann Whitney (\* $P < 0.05$  y \*\* $P < 0.01$ ).

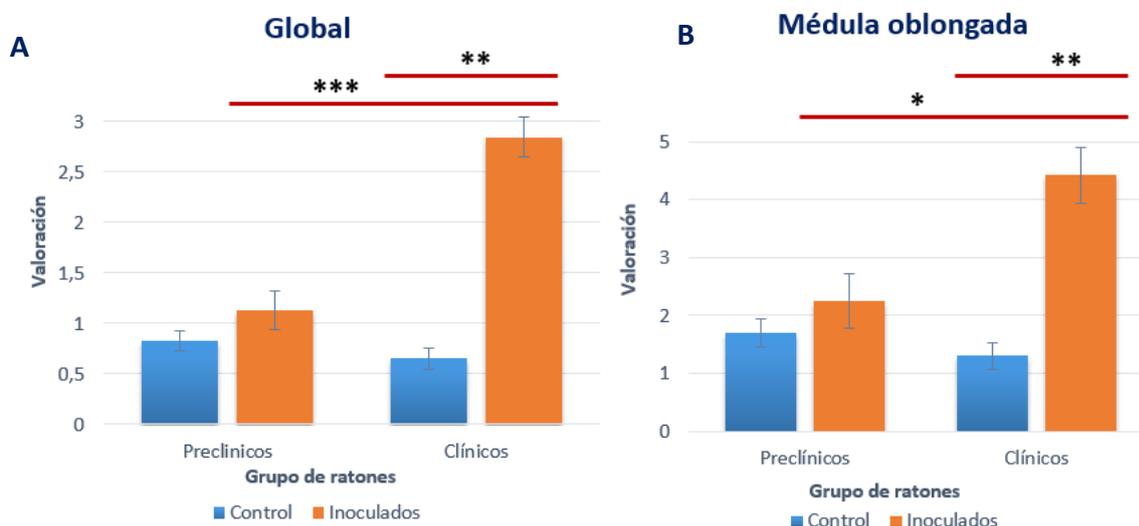
Los ratones inoculados con scrapie en fase clínica presentaron un incremento del grado de lesión estadísticamente significativo (Mann Whitney test  $P < 0.05$ ) con respecto a sus controles en todas las áreas analizadas excepto en el cerebelo. Las regiones más afectadas fueron el tálamo, hipotálamo, colículo y alcanzando el valor máximo en la región de la médula oblongada que es precisamente la zona más afectada por la patología del scrapie clásico (Head, 2001). Aunque las áreas más lesionadas en los animales inoculados en fase preclínica eran las mismas, las diferencias con sus controles no llegaron a ser estadísticamente significativas.

Los ratones control presentaron niveles muy bajos de lesión aunque no llegan a cero, lo que nos puede llevar a pensar que, a pesar de no estar inoculados con scrapie, se ha producido en ellos el fenómeno de la espongirosis debido al factor de la edad ya que estudios previos han demostrado que el envejecimiento se podría asociar con la aparición de dichas lesiones (Behrens et al., 2001). Además,

cabe mencionar el bajo grado de lesión, tanto en ratones infectados como en los ratones control, que se observa en el cerebelo, región que en investigaciones que utilizaban el modelo murino Tg338 ha demostrado ser la menos afectada por la patología.

Con el fin de obtener una idea global del grado de lesión y poder establecer una posible relación con la expresión de miRNAs se calcularon las lesiones medias (véase **Anexo A16**) de todas las zonas analizadas (**Figura 6A**). También se utilizaron las valoraciones de la médula oblongada individualmente (**Figura 6B**), por ser esta el área más próxima a la utilizada para cuantificar la expresión de los miRNAs. Los animales en fase clínica mostraron incrementos significativos de espongiosis a nivel global y en la médula oblongada con respecto a sus controles ( $P < 0.01$ , test de Mann Whitney) y a los animales inoculados en fase preclínica ( $P < 0.001$  globalmente y  $P < 0.05$  en MO, test de Mann Whitney). La espongiosis aparece por tanto en un periodo tardío de la enfermedad, pudiéndose asociar con la pérdida neuronal y con la aparición de la sintomatología.

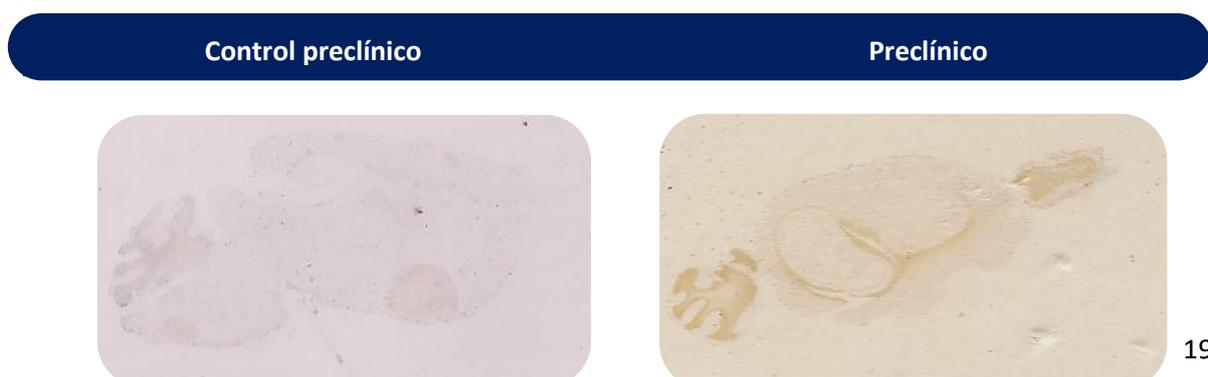
Estos datos nos permiten obtener una idea global del grado de lesión y poder establecer una posible relación con la expresión de miRNAs.



**Figura 6:** Comparación de las lesiones espongiformes a nivel global (A) y en la región de la médula oblongada (B) entre los distintos grupos de ratones Tg338. Las barras muestran los valores medios  $\pm$  error estándar. (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  y \*\*\* $P < 0.001$ , Mann Whitney test).

#### 5.4.2. Valoración del depósito de PrP<sup>Sc</sup> mediante PET Blot

La visualización con la lupa de las membranas de nitrocelulosa utilizadas en la técnica del PET Blot permitió cuantificar el depósito de PrP<sup>Sc</sup> en las distintas áreas del encéfalo y ver cuáles eran las regiones donde había mayor acumulación de dicha proteína (**Figura 7**).





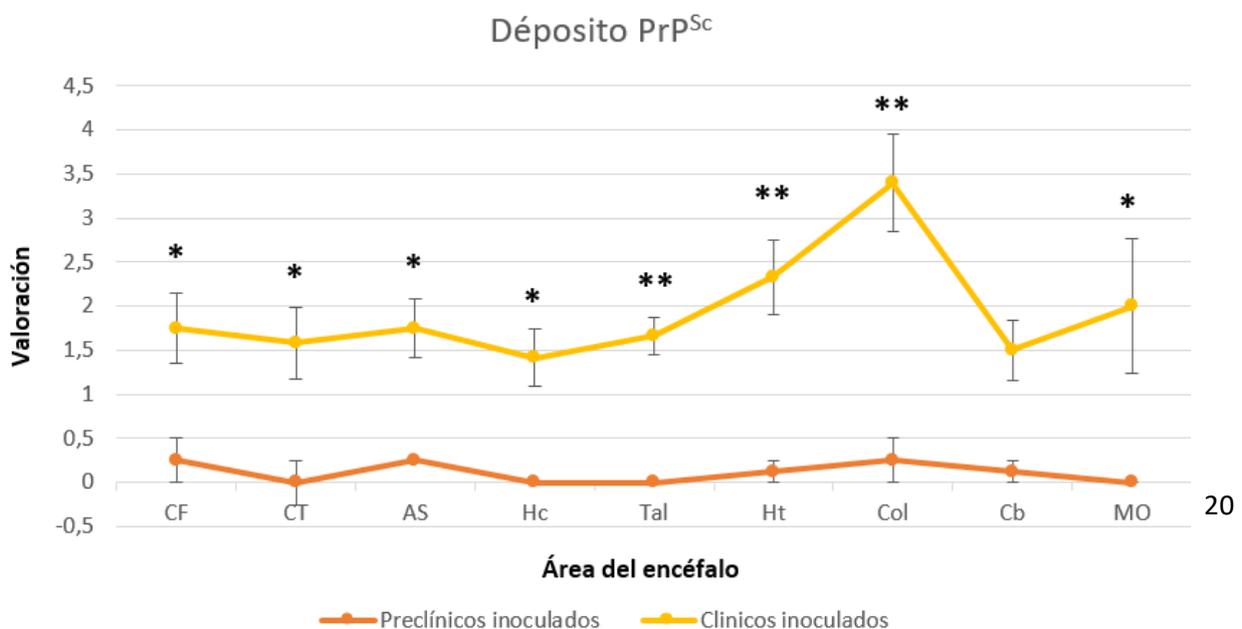
**Figura 7:** Cortes histológicos del encéfalo revelados con NBT/BCIP y representativos de los ratones en fase preclínica y clínica respectivamente tanto control como infectados por scrapie. El depósito de PrP<sup>Sc</sup> se visualiza con una intensa coloración violeta.

Como era de esperar, las muestras de ratones control no presentaban depósitos de PrP<sup>Sc</sup>, que fue observada únicamente en los animales inoculados con scrapie.

La **Figura 7** muestra la cuantificación de los depósitos de PrP<sup>Sc</sup> en las distintas áreas de encéfalo de los ratones Tg338 infectados. Los ratones en fase clínica presentaban niveles más elevados de depósito de PrP<sup>Sc</sup> que los ratones en fase preclínica siguiendo un patrón bastante similar en todas las áreas del encéfalo, pero especialmente reseñable en la región del colículo. Además, se observaba de nuevo que la región del cerebelo es la que presentaba una menor cantidad de esta forma patológica. Las diferencias entre grupos fueron estadísticamente significativas en todas las áreas excepto en la médula oblongada.

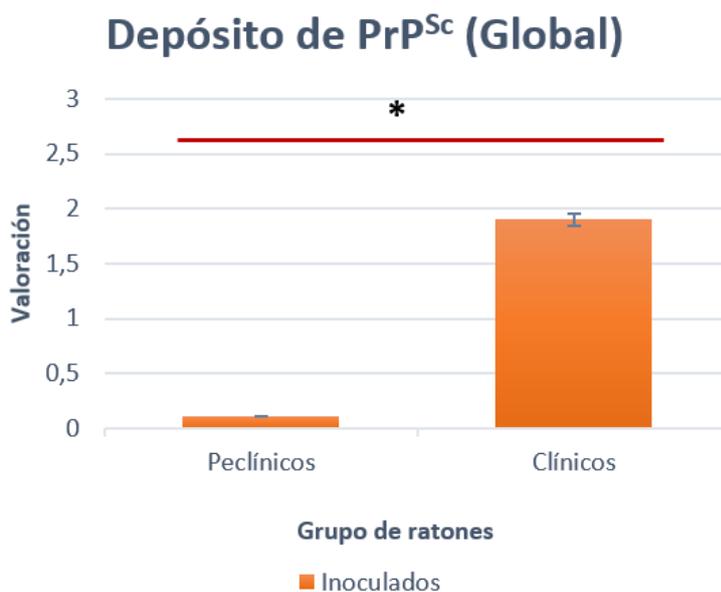
A diferencia de la espongirosis, esta área no fue la más lesionada, observando animales en fase clínica sin depósito de prion (**Tabla A17** de Anexos). Esto puede que suceda por el siguiente motivo. En la enfermedad natural, el animal se infecta por vía digestiva. La aparición inicial del prion se da en el sistema nervioso entérico (ENS), que actúa como portal de entrada para el agente del scrapie, el cual lleva a cabo un transporte retrogrado al cerebro a través del nervio vago, siendo la médula oblongada el primer lugar de acumulación de PrP<sup>Sc</sup>. Sin embargo, los ratones con los que trabajamos estaban inoculados intracerebralmente y no por vía oral, lo que podría explicar la ausencia de depósito de PrP<sup>Sc</sup> en la médula oblongada y la falta de cambios significativos.

La **Figura 8** muestra el depósito de la proteína prion patológica en las diferentes áreas del encéfalo.



**Figura 8:** Perfil lesional con la valoración semicuantitativa del depósito de PrP<sup>Sc</sup> en las diferentes áreas del encéfalo de los distintos grupos de ratones Tg338. Áreas analizadas: corteza frontal (CF), área septal (AS), corteza talámica (CT), hipocampo (Hc), tálamo (Tal), hipotálamo (Ht), cóliculo (Col), cerebelo (Cb) y médula oblongada (MO). Las diferencias significativas fueron determinadas comparando el grupo clínico con el grupo preclínico utilizando el test estadístico de Mann Whitney (\*P<0.05 y \*\*P<0.01).

Para establecer una comparación entre los distintos grupos del acúmulo de PrP<sup>Sc</sup> se realizó la siguiente gráfica, utilizando los datos del **Anexo A18**. En los grupos control, el depósito era inexistente por lo que no queda representado en la **Figura 9**.



**Figura 9:** Comparación del depósito de PrP<sup>Sc</sup> entre los distintos grupos de ratones Tg338. A la izquierda se representa la valoración semicuantitativa global, en todas las áreas del encéfalo. A la derecha queda representada la valoración en la región de la médula oblongada. Las diferencias significativas fueron determinadas comparando el grupo clínico con el control de clínicos y el grupo clínico con el preclínico utilizando el test estadístico de Mann Whitney (\*P<0.05)

Las diferencias significativas se observaron en los ratones en fase clínica y aquellos en fase preclínica. Los ratones infectados con scrapie en fase preclínica apenas presentaron depósitos de esta proteína en las distintas áreas del encéfalo, al sacrificarse relativamente pronto tras la inoculación para ver cambios en estadios tempranos de la enfermedad, no ha dado tiempo a que se formen depósitos detectables con la técnica utilizada. Por el contrario, los ratones infectados en fase clínica presentaron elevados niveles de proteína PrP<sup>Sc</sup>.

## 5.5. Discusión global del estudio

Con todos estos resultados del estudio histopatológico se llega a una serie de conclusiones. Hay diferencias significativas en el grupo clínico y preclínico de acuerdo a los test que se han mencionado previamente. Analizando el encéfalo de manera global, los ratones en fase clínica presentan un mayor grado de vacuolización y espongiosis, así como mayores niveles de depósito de proteína prion patológica que las muestras en fase preclínica. Esto puede ser debido a que las lesiones espongiformes aparecen en un periodo tardío de la enfermedad y se asocian con la pérdida neuronal y con la aparición de sintomatología. Además, la zona de la médula oblongada, principal región afectada por la patología del scrapie, es la que presenta un mayor grado de lesiones espongiformes, al contrario que el cerebelo que es donde parece haber menos lesión y depósito de PrP<sup>Sc</sup>. Los controles, como se esperaba, no presentan lesiones ni acumulación de PrP<sup>Sc</sup>.

Sin embargo, no existe correlación significativa entre el grado de lesión global o de la MO y el valor de expresión. Los únicos miRNAs con una expresión menor en los animales infectados por scrapie han sido el miR-342-3p y el miR-223-3p en el caso de los ratones Tg501 en fase clínica y preclínica, respectivamente. Tan sólo el miR-667-3p tiene una expresión alterada en el modelo murino Tg338, siendo también más baja en los animales inoculados. Este miRNA juega un papel fundamental en la degeneración neuronal y el estrés y su diana principal es la enzima COMT, involucrada en el catabolismo de las catecolaminas, ya que niveles bajos en su expresión provocan un aumento en la expresión de la enzima (Segall et al., 2015). Sin embargo, el resto de miRNAs objeto de estudio no presentan alteraciones significativas en su expresión, lo que nos lleva a pensar que los miRNAs que han sido elegidos para llevar a cabo este estudio no tienen que ver con el depósito de PrP<sup>Sc</sup>, con el proceso de espongiosis ni con las lesiones típicas del scrapie pero sí que podrían estar involucrados en otros procesos biológicos como la neuroinflamación, la gliosis o la pérdida neuronal.

Para poder comprobar que efectivamente los miRNAs analizados están implicados en la patología, sería necesario analizar un mayor número de muestras y además estudiar otras zonas en las que aparezca un mayor grado lesional. También se podrían analizar los niveles de miRNAs circulantes en el plasma para estudiar potentes biomarcadores. Sin embargo, con el estudio realizado no podemos garantizar que estos miRNAs sean biomarcadores universales de la patología. Los animales Tg338 en fase clínica presentaron gran variabilidad individual y vivieron más días, lo que podría explicar la falta de significación en la expresión de los miRNAs.

## **6. Conclusiones**

- En el modelo murino Tg501 se observan cambios significativos en la expresión del miR-342-3p y del miR-223-3p, siendo más baja en los animales infectados por scrapie en fase clínica y preclínica, respectivamente.
- En el modelo murino Tg338 hay una disminución en la expresión del miR-667-3p, siendo menor en los animales inoculados en fase clínica.
- Los animales en fase clínica presentan niveles más elevados de PrP<sup>Sc</sup>, así como un mayor grado de lesiones espongiiformes que los animales en fase preclínica, por tanto las lesiones aparecen en un momento tardío de la patología.
- No existe correlación entre la expresión de estos miRNAs y las lesiones histopatológicas causadas por el scrapie, lo que nos lleva a pensar que podrían estar implicados en otros procesos como la gliosis, la pérdida neuronal o la neuroinflamación, que no han sido analizados en este trabajo.

## **Conclusions**

- In Tg501 mouse model, the levels of miR-342-3p and miR-223-3p are reduced in scrapie-inoculated animals in clinical and preclinical phase, respectively.
- In Tg338 mouse model, there is a reduction in miR-667-3p expression scrapie-inoculated animals of clinical phase.
- Animals in clinical phase present higher levels of protein PrP<sup>Sc</sup>, as well as a higher degree of spongiform lesions than those in preclinic phase, indicating that these lesions appear late in pathology.
- There is no correlation between the expression of the studied miRNA and the histopathological lesions caused by scrapie, suggesting that they might be involved in other biological processes, such as gliosis, neuronal loss or neuroinflammation, that were not studied here.

## **7. Bibliografía**

- Aguzzi, A. and Heikenwalder, M. (2006). Pathogenesis of prion diseases: current status and future outlook. *Nature Reviews Microbiology*, 4(10), pp.765-775.
- Andreoletti O, Simon S, Lacroux C, Morel N, Tabouret G, Chabert A, Lugan S, Corbiere F, Ferre P, Foucras G, Laude H, Eychenne F, Grassi J, Schelcher F. (2004). PrPSc accumulation in myocytes from sheep incubating natural scrapie. *Nat Med*, 10, pp.591-593.
- Basak, I., Patil, K., Alves, G., Larsen, J. and Møller, S. (2015). microRNAs as neuroregulators, biomarkers and therapeutic agents in neurodegenerative diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(4), pp.811-827.
- Baylis, M. and Goldmann, W. (2004). The Genetics of Scrapie in Sheep and Goats. *Current Molecular Medicine*, 4(4), pp.385-396.
- Behrens, A., Brandner, S., Genoud, N. and Aguzzi, A. (2001). Normal neurogenesis and scrapie pathogenesis in neural grafts lacking the prion protein homologue Doppel. *EMBO reports*, 2(4), pp.347-352.
- Bhat, S., Jarmolowski, A. and Szweykowska-Kulińska, Z. (2016). MicroRNA biogenesis: Epigenetic modifications as another layer of complexity in the microRNA expression regulation. *Acta Biochimica Polonica*, 63(4), pp.717-723.
- Boese, A., Saba, R., Campbell, K., Majer, A., Medina, S., Burton, L., Booth, T., Chong, P., Westmacott, G., Dutta, S., Saba, J. and Booth, S. (2016). MicroRNA abundance is altered in synaptoneurosomes during prion disease. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 71, pp.13-24.
- Cheng, L., Quek, C. Y. J., Sun, X., Bellingham, S. A., & Hill, A. F. (2013). The detection of microRNA associated with Alzheimer's disease in biological fluids using next-generation sequencing technologies. *Frontiers in Genetics*, 4, 150.
- Chianini, F., Fernández-Borges, N., Eraña, H., Pang, Y., Vidal, E., Eaton, S., Finlayson, J., Dagleish, M. and Castilla, J. (2013). Prion-resistant or prion-susceptible species, this is the question. *Virulence*, 4(4), pp.333-334.
- Curcio, L., Sebastiani, C., Di Lorenzo, P., Lasagna, E. and Biagetti, M. (2016). Review: A review on classical and atypical scrapie in caprine: Prion protein gene polymorphisms and their role in the disease. *Animal*, 10(10), pp.1585-1593.
- Eghiaian, F., Grosclaude, J., Lesceu, S., Debey, P., Doublet, B., Treguer, E., Rezaei, H. and Knossow, M. (2004). Insight into the PrPC -> PrPSc conversion from the structures of antibody-bound ovine prion scrapie-susceptibility variants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(28), pp.10254-10259.
- Fabian, M. and Sonenberg, N. (2012). The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19(6), pp.586-593.
- Foster JD, Parnham D, Chong A, Goldmann W, Hunter N (2001). "Clinical signs, histopathology and genetics of experimental transmission of BSE and natural scrapie to sheep and goats". *Vet. Rec.* 148(6), pp.165-171.
- Geschwind, M. (2015). Prion Diseases. *Continuum: Lifelong Learning in Neurology*, 21, pp.1612-1638.
- Gough, K. C., & Maddison, B. C. (2010). Prion transmission: Prion excretion and occurrence in the environment. *Prion*, 4(4), pp.275-282
- Head, M. (2001). Prion Diseases: Diagnosis and Pathogenesis. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 27(3), pp.253-254.
- Hébert, S. and De Strooper, B. (2009). Alterations of the microRNA network cause neurodegenerative disease. *Trends in Neurosciences*, 32(4), pp.199-206.

- Hunter, N. (2007). Scrapie—Uncertainties, biology and molecular approaches. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1772(6), pp.619-628.
- Imran, M. and Mahmood, S. (2011). An overview of animal prion diseases. *Virology Journal*, 8, 493.
- Le Dur, A., Beringue, V., Andreoletti, O., Reine, F., Lai, T., Baron, T., Bratberg, B., Vilotte, J., Sarradin, P., Benestad, S. and Laude, H. (2005). A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(44), pp.16031-16036.
- Lee, H.-M., Kim, T. S., & Jo, E.-K. (2016). MiR-146 and miR-125 in the regulation of innate immunity and inflammation. *BMB Reports*, 49(6), pp.311–318.
- Livak, K. and Schmittgen, T. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods*, 25(4), pp.402-408.
- Lukiw, W., Dua, P., Pogue, A., Eicken, C. and Hill, J. (2011). Upregulation of Micro RNA-146a (miRNA-146a), A Marker for Inflammatory Neurodegeneration, in Sporadic Creutzfeldt–Jakob Disease (sCJD) and Gerstmann–Straussler–Scheinker (GSS) Syndrome. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 74(22-24), pp.1460-1468.
- Mall, C., Rocke, D., Durbin-Johnson, B. and Weiss, R. (2013). Stability of miRNA in human urine supports its biomarker potential. *Biomarkers in Medicine*, 7(4), pp.623-631.
- McKintosh E, Tabrizi SJ, Collinge J. (2003). "Prion diseases" *Journal of NeuroVirology*. 9(1), pp.183–193
- Mohr, A. and Mott, J. (2015). Overview of MicroRNA Biology. *Seminars in Liver Disease*, 35(01), pp.003-011.
- Murayama, Y., Imamura, M., Masujin, K., Shimozaki, N., Yoshioka, M., Mohri, S. and Yokoyama, T. (2012). Ultrasensitive detection of scrapie prion protein derived from ARQ and AHQ homozygote sheep by interspecies in vitro amplification. *Microbiology and Immunology*, 56(8), pp.541-547.
- Parveen, I., Moorby, J., Allison, G. and Jackman, R. (2005). The use of non-prion biomarkers for the diagnosis of Transmissible Spongiform Encephalopathies in the live animal. *Veterinary Research*, 36(5-6), pp.665-683.
- Sanz Rubio D, López-Pérez Ó, de Andrés Pablo Á, Bolea R, Osta R, Badiola J, Zaragoza P, Martín-Burriel I, Toivonen J. (2017) Increased circulating microRNAs miR-342-3p and miR-21-5p in natural sheep prion disease. *Journal of General Virology*, 98(2), pp.305-310.
- Segall, S., Shabalina, S., Meloto, C., Wen, X., Cunningham, D., Tarantino, L., Wiltshire, T., Gauthier, J., Tohyama, S., Martin, L., Mogil, J. and Diatchenko, L. (2015). Molecular genetic mechanisms of allelic specific regulation of murine COMT expression. *Pain*, 156(10), pp.1965-1977.
- Truesdell, S., Mortensen, R., Seo, M., Schroeder, J., Lee, J., LeTonqueze, O. and Vasudevan, S. (2012). MicroRNA-mediated mRNA Translation Activation in Quiescent Cells and Oocytes Involves Recruitment of a Nuclear microRNP. *Scientific Reports*, 2, 842.
- Victoria, G., Arkhipenko, A., Zhu, S., Syan, S. and Zurzolo, C. (2016). Astrocyte-to-neuron intercellular prion transfer is mediated by cell-cell contact. *Scientific Reports*, 6, 20762.
- Vogel, G. (1997). Prusiner Recognized for Once-Heretical Prion Theory. *Science*, 278(5336), pp.214-214
- Wang, J., Wang, X. and Gao, X. (2015). Prion Diseases and their Prpsc-Based Molecular Diagnostics. *Journal of Neurology and Neuroscience*, 06(04).
- Westergard, L., Christensen, H. and Harris, D. (2007). The cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>): Its physiological function and role in disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1772(6), pp.629-644.