



Trabajo Fin de Grado

Perfiles de expresión génica en Sistema Nervioso Central de ovino con *Scrapie*, modelo de enfermedad priónica.

Gene expression profiling in the Central Nervous System of sheep with *Scrapie*, a prion disease model.

Autora:

Irene Sánchez Valls

Directoras:

Inma Martín Burriel

Arianne Sanz Fernández

Departamento de Anatomía, Embriología y Genética Animal

Facultad de Veterinaria

Universidad de Zaragoza

2019/2020

ÍNDICE

| | |
|--|--------------|
| 1. Resumen..... | 1 |
| 2. Introducción..... | 2-6 |
| 2.1 Enfermedades priónicas. | |
| 2.2 <i>Scrapie</i> . | |
| 2.2.1 Concepto de cepa (<i>Scrapie</i> clásico y atípico) y susceptibilidad genética. | |
| 2.2.2 Vías de infección, distribución en tejidos y neuropatología. | |
| 2.2.3 Signos clínicos. | |
| 2.2.4 Diagnóstico laboratorial. | |
| 2.3 Estudios genómicos en enfermedades priónicas y antecedentes. | |
| 2.3.1 Arrays de cDNA. | |
| 2.3.2 RNAseq. | |
| 3. Objetivos..... | 7 |
| 4. Materiales y métodos..... | 7-8 |
| 4.1 Muestras utilizadas para la secuenciación por RNAseq. | |
| 4.2 Análisis bioinformático. | |
| 4.2.1 Análisis de vías. | |
| 4.2.2 Selección de biomarcadores tempranos de enfermedad. | |
| 4.3 Selección de genes a validar. | |
| 4.4 Puesta a punto de la amplificación por qRT-PCR de los genes seleccionados. | |
| 4.4.1 Diseño de primers. | |
| 4.4.2 qRT-PCR. | |
| 5. Resultados y discusión..... | 9-18 |
| 5.1 Análisis de ontología y enriquecimiento. | |
| 5.1.1 Comparación Clínico Vs. Control. | |
| 5.1.2 Comparación Preclínico Vs. Control. | |
| 5.1.3 Desarrollo temprano del sistema nervioso. | |
| 5.2 Identificación de potenciales biomarcadores tempranos de enfermedad. | |
| 5.3 Validación de los cambios de expresión. | |
| 6. Conclusiones..... | 19 |
| 7. Bibliografía..... | 20-25 |

1 Resumen/abstract

Las enfermedades priónicas o encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) son un grupo de trastornos cerebrales degenerativos de los mamíferos, caracterizados por la conversión de la proteína priónica normal (PrP^C) a su forma patogénica (PrP^{Sc}). La infección del sistema nervioso central (SNC) por PrP^{Sc} da lugar a un cuadro neuropatológico típico de degeneración espongiforme, pérdida neuronal y perturbación sináptica. El ovino con *Scrapie* es un modelo animal natural para el estudio de la neuropatología asociada a las enfermedades priónicas. Los estudios transcriptómicos, como arrays de cDNA y RNAseq, ponen de manifiesto alteraciones de múltiples vías celulares y cambios en los perfiles de expresión génica que permiten el seguimiento del estado neurodegenerativo y predicción de su evolución. Hasta la fecha, en el modelo ovino no se ha llevado a cabo ningún estudio de expresión diferencial en *Scrapie* mediante secuenciación masiva de RNA, aunque sí que hay estudios centrados en el análisis de los perfiles de miRNA. En el trabajo presente se analizaron los resultados de la secuenciación masiva de RNA de muestras control, preclínicas y clínicas de tejido nervioso central de ovino con *Scrapie*. Se realizó un análisis bioinformático de los resultados, estudiando la expresión diferencial de los genes identificados en la comparación entre grupos y analizando el enriquecimiento de las vías celulares más representativas. Una profunda revisión bibliográfica de las mismas permitió establecer su implicación de ciertas rutas moleculares en la neuropatología de la enfermedad. Además, se identificaron potenciales biomarcadores tempranos de enfermedad, estableciendo su relación con otras patologías neurodegenerativas humanas y se pusieron a punto las condiciones de amplificación mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) para la validación del grupo de genes seleccionado.

Prion diseases, or transmissible spongiform encephalopathies (TSE) are a group of degenerative brain disorders in mammals characterized by the conversion of normal prion protein (PrP^C) to its pathogenic variant (PrP^{Sc}). The PrP^{Sc} infection of the central nervous system leads to the neuropathology of the disease, which involves spongiform degeneration, neuronal loss and synaptic disturbance. Sheep with *Scrapie* offer a natural animal model to study the neuropathology associated with prion diseases. Transcriptomic studies, such as cDNA arrays and RNAseq, reveal alterations of multiple cellular pathways and transcriptional changes that allow monitoring the neurodegenerative state and predicting its evolution. To date, no differential expression study has been carried out in *Scrapie* sheep model using massive RNA sequencing, although some studies have focused on the analysis of miRNA profiles. In the present work, the RNAseq results of control, preclinical and clinical samples of sheep central nervous system with *Scrapie* were analyzed. We performed a bioinformatic analysis, studying the differential expression of the genes identified between samples and the most representative enriched cellular pathways. After a deep bibliographic review, we established the role of the pathways in the neuropathology of the disease. In addition, we identified potential early disease biomarkers, and established their relationship with other human neurodegenerative pathologies. Finally, we determined the quantitative real time (qRT-PCR) conditions for the validation of a selected group of genes.

2 Introducción

2.1 Enfermedades priónicas

Las enfermedades priónicas o encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) pertenecen a un grupo de enfermedades neurodegenerativas que afecta a varias especies de mamíferos, además del hombre. Entre éstas, las más conocida y estudiadas son las que afectan al ganado, incluyendo tanto la encefalopatía espongiforme bovina (EEB), como el *Scrapie* ovino y caprino. Las EET en humanos incluyen, entre otras, la enfermedad de Cretzfeldt-Jakob (CJD), el síndrome Gertmann-Sträussler-Scheinker (GSS), insomnio familiar fatal y el Kuru (1). Otros ejemplos de EET en animales incluyen la encefalopatía transmisible del visón, la caquexia crónica del venado y alces (CWD, Chronic Wasting Disease), la encefalopatía exótica en ungulados (EUE, Exotic Ungulate Encephalopathy) y la encefalopatía espongiforme felina en gatos (2).

Las EET están caracterizadas por la conversión de la proteína priónica normal (PrP^{C} , *cellular prion protein*) a su forma patogénica (PrP^{Sc} , *Scrapie prion protein*), la cual es extremadamente resistente a procesos de inactivación físicos y químicos. La isoforma anómala se acumula en el tejido nervioso conduciendo eventualmente a la degeneración del mismo, formación de placas amiloides, gliosis reactiva y pérdida neuronal.

Las EET presentan largos periodos de incubación, en función de la cepa, el huésped o la vía de transmisión. Además, se diferencian de otros síndromes causados por mal plegamiento proteico por su capacidad de transmitirse a individuos susceptibles tras exposición a PrP^{Sc} (3).

Proteína prión celular

La proteína prión celular está codificada por el gen *PRNP*, de una longitud de 16 kb, localizado en el cromosoma 20, tanto en la especie humana como en ovino. Contiene 2 exones, el primero sirve como sitio de iniciación de la transcripción y el segundo contiene el marco de lectura abierto. El pre-mRNA formado es procesado dando lugar al mRNA maduro que sirve de molde para la síntesis de la proteína prión celular de 253 aminoácidos (4). La PrP^{C} madura resulta en una glicoproteína de 208 aminoácidos que queda anclada a la membrana celular por anclaje glicosilfosfatidilinositol (GPI). La PrP^{C} está implicada en varias funciones cerebrales como protección neuronal, adhesión, señalización celular en el cerebro y control del ritmo circadiano. La proteína prión celular desempeña un papel fundamentalmente en la presinapsis por interacción con proteínas sinápticas, canales iónicos y receptores de neurotransmisores metabotrópicos e ionotrópicos (5).

Proteína prión patológica

Las enfermedades priónicas son resultado de la conversión de la PrP^{C} a su isoforma mal plegada y patológica, con capacidad de agregación, PrP^{Sc} . Asimismo, esta PrP^{Sc} facilita la conversión de la proteína normal PrP^{C} a su isoforma patogénica. Este proceso tiene lugar independientemente del origen de la PrP^{Sc} , ya sea de procedencia externa (ingestión), por mutaciones en el gen *PRNP* o por conversión espontánea de la isoforma salvaje a la anómala (6) (7).

La forma patológica PrP^{Sc} está caracterizada por su alta resistencia a la digestión proteica, insolubilidad y su alto contenido de estructura en hoja plegada β . Mientras que PrP^{C} presenta una estructura fundamentalmente de hélice α (42%) con baja presencia de hoja plegada β (3%), la proteína PrP^{Sc} presenta un 43% de hoja plegada β frente a un 30% de hélices α . En la conversión de PrP^{C} a PrP^{Sc} la hélice A, que permanecía desprotegida, adquiere estructura de hoja plegada β (8).

2.2 Scrapie

La tembladera, también conocida como *Scrapie*, se clasifica como una encefalopatía espongiforme transmisible (EET) de ovino y caprino. Descrita por primera vez en 1732 y ampliamente estudiada hasta la fecha, se considera como uno de los principales modelos animales de estudio de síndromes priónicos.

Los periodos de incubación, deposición de la proteína patogénica y sintomatología varían en función de la cepa de *Scrapie*, el huésped y la vía de transmisión (9).

2.2.1 Concepto de cepa (*Scrapie* clásico y atípico) y susceptibilidad genética

El agente priónico puede encontrarse en forma de múltiples cepas, presentando diferentes signos clínicos, variados periodos de incubación y diferencias en la deposición neuroanatómica de PrP^{Sc} (10). Estas propiedades distintivas de cepa responden a diferencias conformacionales de PrP^{Sc}, ya que no existen diferencias en la secuencia aminoacídica entre PrP^C y PrP^{Sc} (11). No se conoce cómo aparecen las nuevas cepas, pero se postula que podría deberse a flexibilidad conformacional inherente de la proteína, polimorfismos en *PRNP* o por eventos de transmisión interespecie (12).

La designación más importante entre cepas de *Scrapie* se da entre el *Scrapie* clásico y el atípico (Nor98). El gen *PRNP* es polimórfico, en particular en los codones 136, 154 y 171, las variantes en estos codones modulan la susceptibilidad o resistencia al *Scrapie* clásico y atípico (13).

La susceptibilidad a *Scrapie* clásico se asocia con valina 136, arginina 154 y glutamina 171 (haplotipo VRQ). En contraposición, alanina 136, arginina 154 y arginina 171 (haplotipo ARR) confiere resistencia y una baja incidencia tanto en animales homocigotos como heterocigotos. La forma original del gen parece responder al haplotipo ARQ, habiéndose originado las otras variantes por mutaciones puntuales. La forma ARQ también se asocia a susceptibilidad a padecer la enfermedad, aunque con una menor penetrancia que VRQ.

El *Scrapie* atípico parece estar asociado a animales con genotipo resistente a *Scrapie* clásico (ARR) y pocas infecciones se relacionan con el haplotipo sensible VRQ. La histidina (H) en el codón 154 se ha relacionado con una mayor susceptibilidad al *Scrapie* atípico tanto en ovejas como en cabras.

2.2.2 Vías de infección, distribución en tejidos y neuropatología

Las infecciones ocurren principalmente por ingestión en ambientes contaminados, pero las ovejas también pueden ser infectadas experimentalmente vía cavidad conjuntiva o nasal. La mayoría de las ovejas se infectan de su madre en el momento de nacimiento o poco después. La placenta puede contener altos niveles de PrP^{Sc}, de manera que la ingestión de membranas o fluidos fetales constituyen una de las rutas principales de infección. También se ha descrito la infección a través de escarificaciones en la piel (4).

Tras su ingestión, PrP^{Sc} cruza la barrera intestinal de los enterocitos llegando a linfa y sangre, pero solo en los animales susceptibles se produce la acumulación de esta forma patológica en las células dendríticas foliculares de las estructuras linfoides, con la primera replicación del agente priónico en los tejidos linfoides asociados al intestino (14). Los animales infectados, durante esta fase asintomática con deposición de PrP^{Sc} en tejidos linfoides, actúan como una fuente ambiental de contaminación excretando proteínas priónicas en su saliva (15) y heces (16).

Aunque el mecanismo de transferencia de PrP^{Sc} desde el sistema linforreticular hasta el nervioso se desconoce, se sugiere que se produce desde las células dendríticas foliculares hasta las fibras nerviosas que inervan los folículos linfoides (17) (18). Inicialmente, se produce la distribución de PrP^{Sc} a lo largo

del sistema nervioso entérico, llegando hasta el SNC. La deposición inicial en el SNC en *Scrapie* clásico se produce en la médula oblongada, mientras que en *Scrapie* atípico es en la corteza cerebral y cerebelar (19). La infección del SNC por PrP^{Sc} da lugar a la degeneración espongiiforme, pérdida neuronal, alteraciones sinápticas, neuroinflamación por activación de astrocitos y microglía y formación de agregados proteicos (4). La pérdida neuronal se atribuye a la activación de procesos apoptóticos que responden a estrés oxidativo, gliosis reactiva, cambios en la matriz extracelular y pérdida de la función antiapoptótica de PrP^C (4). El cuadro neuropatológico se caracteriza por la hipertrofia e hiperplasia de astrocitos, con vacuolización espongiiforme en el neuropilo de la sustancia gris.

2.2.3 Signos clínicos

Los primeros signos del *Scrapie* clásico son frecuentemente conductuales y las ovejas tienden a separarse del rebaño. Los animales afectados presentan hipersensibilidad a los estímulos, una mirada fija, ataxia y un andar inusual. Posteriormente, desarrollan temblores, especialmente en cabeza y cuello, rechinan los dientes y mantienen la cabeza gacha. Muchas ovejas presentan inflamación pruriginosa de la epidermis, frotándose y rascándose intensamente. La pérdida de peso es común y el vellón de las ovejas adquiere un aspecto seco y quebradizo. Su comportamiento al beber y orinar también puede cambiar. La mayoría de los animales mueren en unas pocas semanas después del inicio de los signos clínicos (20).

Las cabras con *Scrapie* clásico presentan signos conductuales parecidos a las ovejas. El prurito es, sin embargo, menos común y, si ocurre, es mucho menos intenso. La mayoría de las cabras presentan apatía, pérdida de peso y cese prematuro de lactancia. La enfermedad es progresiva y, como en ovejas, fatal (20).

La falta de coordinación y ataxia son los signos clínicos más frecuentes en ovejas con *Scrapie* atípico (Nor98). El prurito es mínimo o poco común, aunque se ha observado en algunos animales. La pérdida de condición corporal, ansiedad, temblores y respuesta de amenaza anormales se han descrito en algunos casos, pero no en otros (13).

2.2.4 Diagnóstico laboratorial

Tradicionalmente, el diagnóstico de las encefalopatías espongiiformes transmisibles se llevaba a cabo por técnicas histológicas mediante la determinación de vacuolización en el tronco encefálico (21).

El diagnóstico actual consiste en la detección de PrP^{Sc} mediante ensayos de inmunoabsorbancia ligado a enzimas, inmunohistoquímica o Western-blot tras pretratamiento con proteinasa K, lo que permite diferenciar entre PrP^C y PrP^{Sc}. En cerebros autolíticos, el diagnóstico se puede realizar mediante búsqueda de fibrillas priónicas por microscopía electrónica. Sin embargo, la prueba tiene baja sensibilidad de manera que se prefieren otros métodos diagnósticos (22).

Otros ensayos de alta sensibilidad como la amplificación cíclica de proteínas mal plegadas (PMCA) y la conversión inducida por temblores en tiempo real (RT-QuIC) permiten identificar animales infectados antes que las técnicas inmunohistoquímicas o de inmunotransferencia. Estos ensayos de alta sensibilidad detectan pequeñas cantidades de priones por la capacidad de conversión de PrP^C a su isoforma patológica. Actualmente se emplean principalmente en investigación, pero se está estudiando su aplicación para el diagnóstico de ovejas y cabras (23).

El *Scrapie* también puede detectarse por inoculación en ratones (bioensayos de roedores) de material biológico procedente de individuos enfermos, sin embargo, el periodo de incubación es de varios meses, lo que hace que la técnica sea poco práctica para el diagnóstico rutinario. Además, las técnicas serológicas no son útiles, ya que no se generan anticuerpos contra proteínas priónicas.

Los ensayos de alta sensibilidad (PMCA y RT-QuIC) se encuentran en un estadio de estudio prematuro y las metodologías inmunohistoquímicas y de inmunotransferencia, aunque sensibles y específicas, solo son aplicables para el diagnóstico post-mortem. El uso de PrP^{Sc} como biomarcador ante-mortem se considera, hasta el momento, muy difícil de aplicar. En consecuencia, se requiere del desarrollo de nuevas pruebas de diagnóstico que no se basen exclusivamente en la determinación de PrP^{Sc} y que permitan la identificación de la enfermedad en fases tempranas de infección (24). Ante esta necesidad, se plantea la búsqueda de biomarcadores indicativos de la presencia de enfermedad y del estado de la misma mediante estudios sobre cambios en los perfiles de expresión génica de tejidos procedentes de animales infectados.

Estos estudios genómicos permiten observar cambios transcripcionales de genes implicados en la neuropatología asociada a la enfermedad y podrían ser utilizados como biomarcadores permitiendo el desarrollo de un diagnóstico rápido y ante-mortem de la infección, así como la determinación de dianas terapéuticas en las EET.

2.3 Estudios genómicos en enfermedades priónicas y antecedentes

Hasta la fecha, se han llevado a cabo varios estudios genómicos, incluyendo el análisis de expresión génica y proteica de animales infectados, tanto en el estadio temprano de la enfermedad, como en el final (25) (26) (27). Estos estudios ponen de manifiesto alteraciones de múltiples vías celulares y cambios transcripcionales que, aunque no son específicos de las EETs, podrían ayudar al seguimiento del estado neurodegenerativo en su traslación a la especie humana o a la predicción de la respuesta al tratamiento. Además, podrían explicar las diferencias individuales en cuanto a susceptibilidad y periodo de incubación (28).

Los estudios mencionados se han realizado en varios modelos animales de EETs, incluyendo el bovino (29), ovino (24) (27) o cérvido (30). En este sentido, cobran especial importancia las técnicas de análisis de patrones de expresión, como los arrays de cDNA o la secuenciación de RNA.

2.3.1 Arrays de cDNA

La tecnología de microarrays, proceso multiplexado basado en la hibridación, permite el análisis simultáneo de una gran cantidad de transcritos. El análisis masivo de un genoma celular resulta esencial para guiar el diagnóstico de la enfermedad y el perfil molecular del paciente. Estos arrays tienen varias aplicaciones, incluyendo la generación de perfiles de expresión génica, detección de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), estudios del estado de metilación del ADN o evaluación de microRNA (31).

El grupo LAGENBIO ha llevado a cabo varios estudios genómicos aplicando la tecnología de los arrays de cDNA, como los realizados en médula oblongada de animales clínicos con *Scrapie*, así como preclínicos; “Perfiles de expresión genética y asociación con lesiones priónicas en la médula oblongada de animales sintomáticos con *Scrapie*” (32) y “Cambios en el transcriptoma de la médula oblongada en *Scrapie* natural presintomático y su asociación con lesiones priónicas” (33), respectivamente. El análisis de las variaciones transcriptómicas de las muestras se llevó a cabo, en ambos estudios, usando un microarray 4x44K, con un set de sondas diseñado a partir de una librería de cDNA obtenida de diversos tejidos de ovino, (sistema nervioso central y tejido linfóide entre otros), procedente de animales sanos y con *Scrapie*. Los estudios realizados revelaron un gran número de sondas con cambios de expresión, a partir de las cuales, con herramientas BLAST, se identificaron decenas de genes con expresión diferencial. Los resultados de los microarrays fueron confirmados con PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)

De acuerdo con los resultados, los genes identificados en muestras de médula oblongada de animales sintomáticos (32) podían agruparse en los siguientes grupos principales: proteínas extracelulares, proteasas lisosómicas, proteínas relacionadas con la respuesta inmune y genes implicados en la

transducción de señales. En cuanto a las muestras de médula oblongada de animales presintomáticos (33), los genes expresados diferencialmente identificados en el estudio codifican fosfoproteínas, proteínas de organización extracelular de la matriz o proteínas implicadas en la respuesta inmune, coincidiendo con los mecanismos descritos en el estudio anterior. Es decir, estos mecanismos parecen estar involucrados en la neuropatología del *Scrapie* desde las fases tempranas preclínicas hasta la manifestación clínica de la enfermedad.

En comparación con otros estudios independientes de arrays de cDNA (34) (35), los genes que aparecen expresados de forma diferencial, varían entre estudios en función del tejido analizado y la especie. Esto es indicativo de la ausencia de cambios universales asociados a la infección priónica. Sin embargo, las rutas metabólicas en las que están implicados estos genes coinciden (respuesta inmune, respuesta inflamatoria, vía apoptótica y adhesión celular), lo que subraya la importancia de éstas en la patología de la enfermedad.

2.3.2 RNAseq

La secuenciación del transcriptoma entero es otra herramienta de gran interés con diversas aplicaciones, como la reconstrucción “*de novo*” de un transcriptoma (sin referencia del genoma) o evaluación de variaciones de nucleótidos, entre otras (36). En el contexto de este trabajo resulta de gran utilidad para la identificación de genes expresados diferencialmente entre condiciones determinadas, como entre animales infectados con *Scrapie* y animales control.

En esta tecnología, en primer lugar, las muestras de RNA se retrotranscriben y fragmentan en pequeños cDNA y se secuencian masivamente con una plataforma de alto rendimiento. Las secuencias generadas se asignan a un genoma o transcriptoma y se estiman los niveles de expresión para cada gen o isoforma. Los datos se normalizan utilizando, diversos métodos estadísticos, y se identifican los genes expresados diferencialmente (36). Por último, los datos se evalúan en su contexto biológico. Con el aumento de popularidad de la tecnología RNAseq se han desarrollado múltiples softwares para el análisis de expresión diferencial.

La tecnología de secuenciación de RNA presenta algunas ventajas frente a los microarrays de cDNA, como la reproducibilidad de enormes cantidades de datos, lo que reduce los números de replicados para cada experimento. Además, permite identificar y cuantificar la expresión de isoformas y transcritos desconocidos. Los microarrays requieren de información *a priori* sobre la secuencia o el genoma/transcriptoma de referencia para el diseño de las sondas, lo que limita la aplicación de la tecnología. Además, la hibridación cruzada y ruido de fondo de los microarrays genera problemas de especificidad y sensibilidad para algunos genes, problemas que se solucionan con la aplicación de RNAseq (37).

Hasta la fecha, aunque algunos estudios se han centrado en el análisis de miRNA en la enfermedad (38) (39), no se ha llevado a cabo ningún estudio de expresión diferencial en *Scrapie* utilizando la tecnología de secuenciación masiva de RNA. Debido a las limitaciones técnicas de la tecnología de microarrays, los estudios mencionados se complementarían comparando los perfiles transcripcionales de diversos tipos celulares aplicando RNAseq. Esta técnica permitiría un análisis transcriptómico mucho más amplio y una mayor capacidad para detectar nuevos transcritos (29).

3 Objetivos

- Realizar un análisis bioinformático de los resultados del estudio de RNAseq para la identificación de rutas moleculares implicadas en *Scrapie*.
- Estudiar la posible implicación de las rutas identificadas en la biopatología de *Scrapie* y otras enfermedades neurodegenerativas.
- Analizar los resultados de RNAseq para identificar potenciales biomarcadores tempranos de la enfermedad.
- Seleccionar, realizando una búsqueda bibliográfica, un panel de genes con expresión diferencial del estudio de RNAseq según su función celular y relación con enfermedades neurodegenerativas.
- Poner a punto las condiciones de amplificación mediante qRT-PCR para la validación de los cambios de expresión en los genes seleccionados.

4 Materiales y métodos

4.1 Muestras utilizadas para la secuenciación por RNAseq

El estudio de RNAseq se llevó a cabo en el Centro Nacional de Análisis Genómicos (CNAG, Barcelona). Para este análisis se utilizaron un total de 11 muestras de tálamo de ovino: 4 obtenidas de animales clínicos, 3 de preclínicos y 4 controles. Todas las muestras provenían de hembras de la raza Rasa Aragonesa con genotipo para el gen *PRNP* ARQ/ARQ. La edad de los animales control y de los clínicos fue similar: $4,75 \pm 0,5$ años y $4,35 \pm 1,23$ años, respectivamente. Siendo los animales preclínicos más jóvenes: $2,27 \pm 1,12$ años.

4.2 Análisis bioinformático

El análisis de expresión diferencial de la CNAG se realizó con *limma-voom* (v.3.34.9) combinado con *sva* (v.3.26.0) para eliminar la variación ($n_{sv}=2$). Los transcritos detectados mediante RNAseq se ordenaron comparando la expresión entre los grupos muestreados (clínicos, preclínicos y controles). Así, los datos de expresión promedio se clasifican en 3 grupos diferentes en función de las comparaciones realizadas: “Clínicos Vs. Control”, “Preclínicos Vs. Control” y “Clínicos Vs. Preclínicos”, indicando el *fold-change* ($\log_{2}FC$), la significación estadística (valor *p*), el nivel de expresión promedio (*AveExpr*), el valor *T* y el valor del estadístico *B* para cada una de las sondas.

Los genes que mostraron expresión diferencial entre grupos se cribaron seleccionando aquellas entradas con $|\log_{2}(FC)| > 1.5$ y valor de $p < 0,05$, consideradas con expresión diferencial y estadísticamente significativas, para cada uno de los 3 grupos. Los transcritos seleccionados se identificaron con ENSEMBL (40).

4.2.1 Análisis de vías enriquecidas

La herramienta informática ShinyGO, versión 0.61 (41) se utilizó para determinar el enriquecimiento de procesos por ontología de los genes con expresión diferencial obtenidos a partir de las 3 comparaciones entre grupos (“Clínicos Vs. Control”, “Preclínicos Vs. Control” y “Clínicos Vs. Preclínicos”). El software calcula los términos GO sobrerrepresentados en el grupo de genes analizados y los organiza en una red de términos GO significativos. Se aplica el test estadístico de distribución hipergeométrico y el test de corrección múltiple Benjamini & Hochberg FDR, con un nivel de significación del 0,05.

Los resultados de enriquecimiento se contrastaron con lo descrito en la bibliografía utilizando la base de datos PubMed para intentar establecer la relación de los mismos con la biopatología de *Scrapie*. La aplicación BioGRID 3.5.187 (42) se empleó para establecer las redes de interacción génicas de interés.

4.2.2 Selección de biomarcadores tempranos de enfermedad

Con el fin de determinar posibles biomarcadores tempranos de la enfermedad se seleccionaron los genes con expresión diferencial en las muestras preclínicas frente al grupo control ($|\log(\text{FC})| > 1.5$) y valor de $p < 0.05$. La relación de los potenciales biomarcadores con enfermedades neurodegenerativas se llevó a cabo mediante una extensiva búsqueda en PubMed.

4.3 Metodología para la selección de genes para validar

Una vez cribados los resultados e identificados los transcritos, los genes se anotaron funcionalmente, empleando GeneCards (43), UniProtKB/Swiss-Prot (44) y PubMed (NCBI), indicando la implicación biológica y función molecular. Se seleccionaron los genes con cambios de expresión más significativos y con un papel funcional en el sistema nervioso y/o relación con síndromes neurodegenerativos, conformando un panel total de 28 genes (**Tabla 1, Anexo**).

4.4 Puesta a punto de la amplificación por qRT-PCR de los genes seleccionados:

4.4.1 Diseño de primers

La secuencia de los primers diseñados para los 28 genes se recogen en la **Tabla 2 del Anexo**. El diseño se realizó con el servidor Primer3 (45) (46) a partir de secuencias génicas de *Ovis aries* (NCBI), incluyendo el borde exón-exón para evitar la amplificación de DNA genómico en la PCR. En caso de existir múltiples variantes de splicing para un mismo gen, se realizó un BLAST de todas las secuencias y se diseñaron los primers en las zonas del cDNA conservadas entre las distintas isoformas.

Previo a la qRT-PCR para la validación de la expresión de los genes seleccionados, es necesario poner a punto la amplificación. El cDNA empleado se obtuvo de la retrotranscripción de muestras de RNA de ovejas clínicas, preclínicas y controles, utilizando el kit Qscript cDNA supermix (Quanta Bioscience). La preparación se llevó a cabo mezclando 1 μl de RNA, 15 μl de H_2O y 4 μl de qScript cDNA Supermix, manteniendo las muestras y reactivos en hielo, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Mezclados y centrifugados los componentes, las muestras se incubaron en termociclador con el programa Quanta: 25 °C 5', 42 °C 30', 85 °C 5' y 4 °C ∞ .

La especificidad de los primers, así como concentración y temperatura óptima de los mismos se analizaron mediante la realización de una PCR a punto final, mezclando 4,8 μl H_2O , 1 μl de tampón 10X Tris-HCl, 0,3 μl Cl_2Mg , 1,6 μl dNTPs, 0,1 μl oligo directo y 0,1 μl oligo reverso, 0,1 μl Taq polimerasa y 2 μl de cDNA, obteniendo una mezcla final con un volumen de 10 μl . Las muestras amplificadas se llevaron a electroforesis estándar en gel de agarosa al 2%.

4.4.2 qRT-PCR

Las muestras y primers empleados fueron los mismos que los descritos en el apartado anterior (**Tabla 2, Anexos**). La qRT-PCR se llevó a cabo empleando *SYBR Green*. La amplificación se realizó por triplicado, en un volumen total de 5 μl , con 1 μl de cDNA (dilución 1:5), y primers a una concentración final de 0,3 μM . Para normalizar la expresión de cada gen analizado, se empleó como referencia interna los genes *G6PDH* y *SDHA*, con expresión estable en estudios de *Scrapie* (47) (48).

5 Resultados y discusión

El análisis mediante RNAseq y su posterior análisis bioinformático identificó la expresión de un total de 13.617 transcritos distintos. Tras el cribado, los transcritos anotados e identificados que exhibieron cambios en la expresión con $|\log_{2}FC| > 1,5$ y valor $p < 0,05$, se redujeron a 41 genes con expresión diferencial en SNC de animales clínicos con respecto a los controles, de los cuales 19 aparecen infra-expresados y 22 sobre-expresados; 36 genes se expresaron diferencialmente entre los tejidos de animales clínicos y preclínicos, con 24 infra-expresados y 12 sobre-expresados, y 23 entre Preclínicos y controles, con 12 infra-expresados y 11 sobre-expresados (**Tabla 3**). De estos genes con expresión diferencial, los cambios de 11 son comunes en clínicos y preclínicos frente a los controles y 7 se expresan de forma diferencial en los clínicos con respecto a ambos grupos (**Figura 1**).

Tabla 3. Genes identificados en SNC con valor $p < 0.05$, estadísticamente significativos, y expresión diferencial, $|\log_{2}FC| > 1.5$, para cada uno de los tres grupos estudiados: “Clínicos Vs. Control”; “Clínicos Vs. Preclínicos” y “Preclínicos Vs. Control”.

| Grupo | Infra-expresados LogFC<1,5 y valor p<0,05 | Sobre-expresados LogFC>1,5 y valor p<0,05 |
|---------------------------------|--|---|
| Clínicos Vs. Control | <i>PMCH, LXN, KRT16, GLP1R, KLK7, CP4B1, SHISA3, PPP1R17, STRA6, MMRN1, CYP26B1, MPZL2, SEMA3A, LTBP2, COL6A3, MX2, XPNPEP2, TNFSF10, CD6</i> | <i>NEXN, KITLG, ASB2, DAO, NTNG1, ANKRD34C, PCP4, MYBPC2, MAB21L1, ZIC1, AGMO, SPTSSB, ZIC4, MAB21L2, GRID2IP, SPTBN5, SFRP5, SLITRK6, OTX2, GBX2, LHX9, CHRNA2</i> |
| Clínicos Vs. Preclínicos | <i>KRT16, CYP4B1, MMRN1, CCDC73, AHSG, FAM92B, SPATA18, PPP1R32, GRIN3B, ADGRD2, TTLL6, RSPH4A, MAP3K19, COL17A1, TTC34, LRRC23, ZAN, WDR63, RASL12, TCTE1, GPR149, WDR38, RERGL, CHRDL2</i> | <i>MFRP, TTR, WFIKKN2, NAIP, PRSS12, MAB21L2, SPTBN5, SFRP5, OTX2, SLC10A4, SLC5A5, KL</i> |
| Preclínicos Vs. Control | <i>MFRP, TTR, WFIKKN2, LXN, STRA6, SIX3, SHISA3, ISLR, NAIP, LTBP2, COL8A1, CD6</i> | <i>EGR2, MYBPC2, KITLG, TCTE1, SPTSSB, TTLL6, SLC14A1, AHSG, GRID2IP, LHX9, CHRNA2</i> |

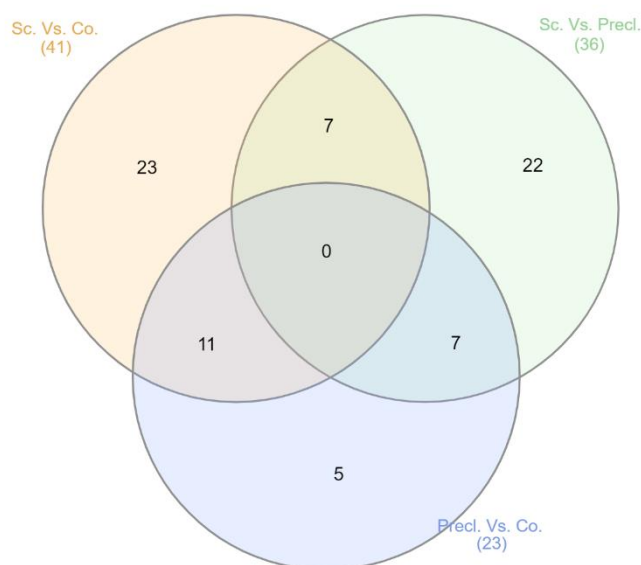


Figura 1. Diagrama de Venn (91) de los genes con expresión diferencial para los 3 grupos comparativos: “Sc Vs. Co” en naranja (*Scrapie*/clínicos frente a controles); “Sc Ps. Precl” en verde (*Scrapie*/clínicos frente a preclínicos); “Precl Vs. Co” en azul (Preclínicos frente a controles).

5.1 Análisis de ontología y enriquecimiento

El análisis ShinyGO (41) para los genes con expresión diferencial entre el grupo de animales clínicos y los controles indica un enriquecimiento, principalmente, en vías implicadas en procesos de guía neuronal y axonal. Respecto a las diferencias observadas entre preclínicos y controles, el enriquecimiento se da en procesos implicados en el desarrollo de órganos sensoriales, particularmente atendiendo a la visión. El análisis entre los grupos preclínico y clínico no mostró ningún enriquecimiento significativo en los genes regulados de forma diferencial. La alta variabilidad de las muestras, con alguna preclínica cercana a la fase clínica, explicaría los pocos cambios registrados. A continuación, se detallan los resultados de enriquecimiento detectados en los genes regulados diferencialmente entre los distintos grupos.

5.1.1 “Clínico Vs. Control”

Los principales procesos funcionales enriquecidos de forma significativa entre los genes con expresión diferencial entre tejidos de animales clínicos y controles aparecen relacionados con la morfogénesis celular, atendiendo a proyección neuronal, diferenciación y estructura anatómica. (**Tabla 4**). Cualquier cambio en la expresión de los genes implicados en estas vías, puede conducir a la alteración en la progresión de las neuronas, desde su formación hasta la estructura madura, dando lugar a neuritis distróficas y defectos en el transporte axonal.

Tabla 4. Rutas funcionales enriquecidas estadísticamente significativas en los genes con expresión diferencial en la comparativa “Clínicos Vs. Control”, aplicando el test estadístico de distribución hipergeométrico y el test de corrección múltiple Benjamini & Hochberg FDR (nivel de significación del 0,05).

| FDR | Rutas funcionales | Genes |
|-----------|---|--|
| 0.0002178 | Morfogénesis de la estructura anatómica. | <i>SEMA3A, MYBPC2, NEXN, COL6A3, SLITRK6, OTX2, CYP26B1, LHX9, NTNG1, GBX2, MAB21L2, KRT16, SFRP5, STRA6, ZIC1, SPTBN5, MPZL2, MAB21L1</i> |
| 0.0004271 | Axogenesis. | <i>SEMA3A, NEXN, SLITRK6, ORX2, NTNG1, GBX2, LHX9, SPTBN5</i> |
| 0.0005419 | Desarrollo axonal. | <i>SEMA3A, NEXN, SLITRK6, OTX2, NTNG1, GBX2, LHX9, SPTBN5</i> |
| 0.0006744 | Guía de proyección neuronal. | <i>SEMA3A, NEXN, OTX2, GBX2, LHX9, SPTBN5</i> |
| 0.0006744 | Morfogénesis celular implicada en diferenciación. | <i>SEMA3A, NEXN, COL6A3, SLITRK6, OTX2, NTNG1, GBX2, LHX9, SPTBN5</i> |
| 0.0006744 | Guía axonal. | <i>SEMA3A, NEXN, OTX2, GBX2, LHX9, SPTBN5</i> |
| 0.0006744 | Morfogénesis celular implicada en la diferenciación neuronal. | <i>SEMA3A, NEXN, SLITRK6,</i> |
| 0.0012174 | Morfogénesis de proyección celular limitada por la membrana plasmática. | <i>SEMA3A, NEXN, SLITRK6, OTX2, NTNG1, GBX2, LHX9, SPTBN5</i> |
| 0.0012174 | Morfogénesis de proyección neuronal. | <i>SEMA3A, NEXN, SLITRK6, SLITRK6, OTX2, NTNG1, GBX2, LHX9, SPTBN5</i> |
| 0.0012174 | Morfogénesis de proyección celular. | <i>SEMA3A, NEXN, SLITRK6, SLITRK6, OTX2, NTNG1, GBX2, LHX9, SPTBN5</i> |

Una profunda revisión bibliográfica de las vías funcionales mencionadas nos ha llevado a identificar los procesos moleculares implicados detrás de ellas. En este contexto, los genes de nuestros resultados (**Tabla 4**) reflejan la implicación de dos eventos moleculares de especial interés: la autofagia y la vía de señalización Wnt.

Autofagia

Apoyando nuestros resultados de enriquecimiento, son varios los estudios que describen la formación de neuritas distróficas en *Scrapie* experimental y otras enfermedades priónicas, incluyendo BSE, CJD y GSS (49) (50). Las neuritas distróficas responden a procesos neuronales anormales de expansión distrófica y acumulación de orgánulos celulares, como vacuolas autofágicas y cuerpos lisosomales.

La autofagia, como proceso de digestión celular, cumple un papel muy importante en el control intracelular, sobre todo en aquellos tejidos en los que las células, como las neuronas y miocitos, no se dividen tras la diferenciación. Además de la función basal de la autofagia en condiciones normales, este proceso adquiere una relevancia añadida en condiciones de enfermedad, pues se considera que la degradación de proteínas patológicas, como PrP^{Sc}, es altamente dependiente de procesos autofágicos y del sistema ubiquitina-proteasoma (51) (52). Aunque se sabe que la autofagia tiene un efecto beneficioso en la protección frente a la neurodegeneración, se desconoce cómo lo hace. Una de las hipótesis principales propone que la autofagia elimina agregados proteicos y cuerpos de inclusión a través de diferentes adaptadores, siendo p62/sequestosoma-1 (SQSTM1) un posible adaptador (53). La mayoría de los agregados proteicos patológicos aparecen marcados con ubiquitina y, en el caso de enfermedad priónica, se ha descrito la relación entre cerebros de ratón infectados con niveles aumentados de conjugados de ubiquitina. SQSTM1 contiene dominios tanto de unión a LC3 como dominios de unión a ubiquitina, de manera que permite el reconocimiento de agregados proteicos por parte de LC3, proteína de membrana del autofagosoma en formación (54).

Son varios los genes representados en nuestros resultados para los que se conoce su implicación en procesos autofágicos, pudiendo dar lugar a la distrofia y alteración de la guía axonal recogida en las rutas enriquecidas. Entre ellos encontramos la cadena $\alpha 3$ del colágeno VI (*COL6A3*), miembro de la familia de los colágenos, que forma redes de microfilamentos en la matriz extracelular (3). Estudios *in vitro* e *in vivo* demuestran que el colágeno VI interviene en la apoptosis y autofagia, ambos procesos intracelulares clave en la homeostasis del SNC (55). Por tanto, la ausencia de colágeno VI, por infra-expresión del gen en animales con *Scrapie*, provocaría la alteración del flujo autofágico, con otros genes implicados en el proceso, como *ATG5*, también disminuyendo su expresión en fases tardías. Esta disminución se ha relacionado con una parada del proceso de autofagia (56).

COL63A actúa como regulador en la diferenciación de células de Schwann y en la preservación de la mielinización de nervios periféricos, siendo necesario para la regeneración nerviosa tras lesión (3). Además, está demostrado que el colágeno VI cumple un papel neuroprotector en situación de estrés y neurodegeneración (3). La supresión del ortólogo del gen *COL6A3* en pez cebra, da lugar a anomalías en la ramificación y extensión neuronal (57), lo que explica la alteración de las vías de “morfogénesis de la estructura anatómica” y “morfogénesis celular implicada en diferenciación” (**Tabla 4**) de nuestros resultados GO. Los resultados de Zetch y colaboradores (57), además, asocian la pérdida de función de *COL63A* con la distonía, pudiendo nuestros resultados sugerir una posible asociación entre la infra-expresión de este gen (y pérdida de la matriz extracelular) y las contracciones involuntarias o tembladeras típicas del *Scrapie*.

Estudios previos (24) también describen cambios en la expresión de otros genes de la familia de los colágenos (*COL1A2*, *COL3A1* y *COL12A1*) y el enriquecimiento de la ruta de interacción matriz extracelular-receptor en el análisis de ontología, apoyando así nuestros resultados.

En la misma línea, nuestros resultados reflejan cambios en el patrón de expresión del gen *OTX2*, que codifica para el factor de transcripción Homeobox *OTX2*, que desempeña un papel importante en el cerebro y desarrollo de órganos sensoriales. A partir del análisis por BioGrid (42) de *OTX2* (**Figura 2**) encontramos que interacciona con otros factores de transcripción, como *SOX2*, cuya expresión ectópica se ha relacionado con la inducción de vías autofágicas (58), *FOXO2*, con cada vez una mayor evidencia en cuanto al papel que cumplen los factores de la familia *FOXO* en la regulación de genes implicados en autofagia y en el sistema ubiquitina-proteasoma (59), además de *NANOG*, y *POU5F1*, que posteriormente se discutirán. Entre las interacciones de *OTX2*, se incluyen también las proteínas Ataxina 1 (*ATXN1*) (60), quinasas dependientes de Ciclina 4 y 6 (*CDK4/6*) (61) relacionadas con la activación de vías autofágicas vía mTOR. Nuestros resultados podrían sugerir, por tanto, la intervención indirecta de *OTX2*, a partir de su red de interacción, en el proceso autofágico.

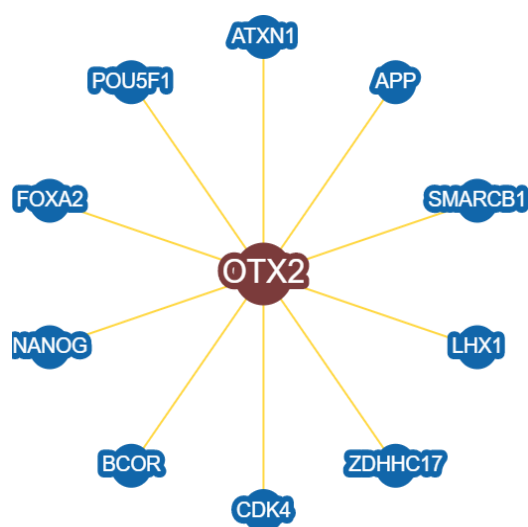


Figura 2. Red de interacción de *OTX2*. Se observa la implicación indirecta de *OTX2*, vía interacción con los intermediarios *SOX2*, *FOXO2*, *ATXN1*, en vías autofágicas. La alteración en la expresión de *OTX2* sugiere la desregulación del flujo autofágico en animales con *Scrapie*.

Señalización Wnt

Siguiendo con el análisis de los procesos moleculares detrás de las vías metabólicas identificadas en el enriquecimiento, nuestros resultados indican expresión diferencial de genes relacionados con la vía de señalización Wnt. En este contexto, las proteínas Wnt han sido identificadas como moléculas de guía axónica conservadas en vertebrados e invertebrados (62).

Se ha propuesto que la activación local de la vía Wnt canónica podría regular la polaridad neuronal y el crecimiento axonal, por acción de Wnt3a como reguladora de la formación y crecimiento del axón mediante activación de señalización intracelular local, conduciendo a la remodelación de los microtúbulos. Entre nuestros resultados, encontramos que *SFRP5* muestra una expresión diferencial en animales enfermos respecto a los controles. *SFRP5* codifica para el miembro 5 de la familia sFRP, caracterizada por presentar un dominio rico en cisteína, homólogo al sitio de unión putativo de las proteínas Wnt en los receptores Frizzled. *SFRP5* está, por tanto, implicada en el secuestro de proteínas Wnt impidiendo su unión a los complejos receptores (63). En la misma línea, son varios los estudios previos que describen el deterioro en la señalización Wnt/ β -catenina en cerebros de ratones infectados con agentes priónicos (64).

Atendiendo a los resultados discutidos previamente, no resulta sorprendente el cambio en la expresión de *GBX2*. *GBX2* pertenece a la subfamilia de factores de transcripción de homeodominio involucrados en el posicionamiento del istmo, que modela el mesencéfalo y

cerebelo en vertebrados (65). Se ha descrito la implicación de *GBX2* en la formación de la cresta neural por respuesta de sus elementos reguladores a vías de señalización Wnt/ β -catenina (66). La disfunción de la vía, como consecuencia de los cambios en el patrón de expresión de *SFRP5*, explicaría asimismo la alteración en la expresión de *GBX2*.

Nuestros resultados de las vías identificadas, en conjunto, revelan una perturbación de la vía de señalización Wnt propuesta como reguladora de la formación y crecimiento del axón: “morfogénesis de la estructura anatómica”, “axogénesis”, “desarrollo axonal”, “morfogénesis de proyección celular”, “morfogénesis de proyección neuronal” (**Tabla 4**).

Eventos moleculares neuronales

Otros de los genes con expresión diferencial, aunque sin relación directa aparente con los dos procesos moleculares previamente discutidos, presentan una evidente relación con las vías GO identificadas, dadas las funciones fisiológicas que sus productos proteicos desempeñan en el sistema nervioso.

En este contexto, son varios los genes que aparecen sobre-expresados en nuestros resultados, incluyendo *NTNG1*, *ZIC1*, *NEXN* y *LHX9*. En líneas generales, *NTNG1* codifica para una proteína de adhesión a membrana axonal que, por interacción con su ligando NGL-1, media en la proyección de axones talámicos (67) (68). De forma similar, los niveles del factor de transcripción *ZIC1* resultan determinantes en el desarrollo de circuitos pontocerebelosos. Un aumento en los niveles de *ZIC1*, tal y como se registra en nuestros resultados en animales con *Scrapie*, se ha relacionado con cambios en la “lateralidad” y dirección de los axones, con mayor proporción de proyecciones ipsilaterales, en lugar de contralaterales (69), resultando en alteraciones de la estructura anatómica de morfogénesis (**Tabla 4**). En cuanto a *NEXN*, el gen codifica para la nexilina, clave en la regulación de células progenitoras de oligodendrocitos mediante la interacción con F-actina. Las células progenitoras de oligodendrocitos son reclutadas a zonas dañadas donde se diferencian a oligodendrocitos remielinizantes maduros, participando en la formación de nuevas vainas de mielina alrededor de los axones (“Morfogénesis celular implicada en diferenciación”, **Tabla 4**). Por último, *LHX9* es un factor de transcripción que pertenece a la familia de genes LIM homeobox. De forma similar a la función discutida para *ZIC1*, *LHX9* actúa, junto a *LHX1*, como interruptor en el control de la dirección axonal (70).

Por el contrario, el gen *SEMA3A* (Semaforina 3A) aparece infra-expresado en animales con *Scrapie*. Las semaforinas corresponden a una de las familias más estudiadas en el desarrollo neuronal. En este sentido, los conos de crecimiento neuronal “navegan” estableciendo las conexiones apropiadas, mediante un mecanismo de señales atractivas o repulsivas, que favorecen o impiden el establecimiento de determinadas conexiones. La Semaforina 3A actúa como un factor repulsivo que induce el colapso y retracción de los conos, mediando en la repulsión axónica. Niveles reducidos de proteína en tejidos nerviosos revelan, por tanto, proyecciones anormales de axones sensoriales y orientación anómala de neuritas (71) (**Tabla 4**).

5.1.2 “Preclínicos Vs. Control”

Nuestros resultados revelan el enriquecimiento de vías celulares que pueden agruparse, por un lado, en el desarrollo de órganos y, por otro lado, en la regulación de la actividad peptidasa. El primer grupo incluye vías de morfogénesis de órganos, en particular los sensoriales, con morfogénesis y desarrollo del sistema ocular, y responde a la alteración de la expresión de los genes *MYBCP2*, *LHX9*, *SIX3*, *COL8A1*, *MFRP* y *STRA6*. El segundo grupo, regulación negativa

de la actividad endopeptidasa, resulta de cambios en la expresión de *AHSG*, *NAIP*, *LXN* y *WFIKKN2* (Tabla 5, Figura 3).

Tabla 5. Rutas funcionales enriquecidas significativas para los genes con expresión diferencial en el grupo “Preclínicos Vs. Control”, aplicando el test estadístico de distribución hipergeométrico y el test de corrección múltiple Benjamini & Hochberg FDR, con un nivel de significación del 0,05.

| FDR | Rutas funcionales | Genes |
|-----------|--|--|
| 0.0052874 | Morfogénesis ocular | <i>SIX3</i> , <i>COL8A1</i> , <i>MFRP</i> , <i>STRA6</i> |
| 0.0122627 | Morfogénesis órganos sensoriales | <i>SIX3</i> , <i>COL8A1</i> , <i>MFRP</i> , <i>STRA6</i> |
| 0.0122627 | Regulación negativa de actividad peptidasa | <i>AHSG</i> , <i>NAIP</i> , <i>LXN</i> , <i>WFIKKN2</i> |
| 0.0122627 | Regulación negativa de actividad endopeptidasa | <i>AHSG</i> , <i>NAIP</i> , <i>LXN</i> , <i>WFIKKN2</i> |
| 0.0127073 | Desarrollo de camera-type | <i>SIX3</i> , <i>COL8A1</i> , <i>MFRP</i> , <i>STRA6</i> |
| 0.0127073 | Diferenciación sexo femenino | <i>KITLG</i> , <i>LHX9</i> , <i>STRA6</i> |
| 0.0127073 | Morfogénesis camera-type | <i>SIX3</i> , <i>COL8A1</i> , <i>STRA6</i> |
| 0.0145530 | Desarrollo sistema visual | <i>SIX3</i> , <i>COL8A1</i> , <i>MFRP</i> , <i>STRA6</i> |
| 0.0145530 | Desarrollo ocular | <i>SIX3</i> , <i>COL8A1</i> , <i>MFRP</i> , <i>STRA6</i> |
| 0.0145530 | Morfogénesis de órganos animales | <i>MYBPC2</i> , <i>SIX3</i> , <i>LHX9</i> , <i>COL8A1</i> , <i>MFRP</i> , <i>STRA6</i> |

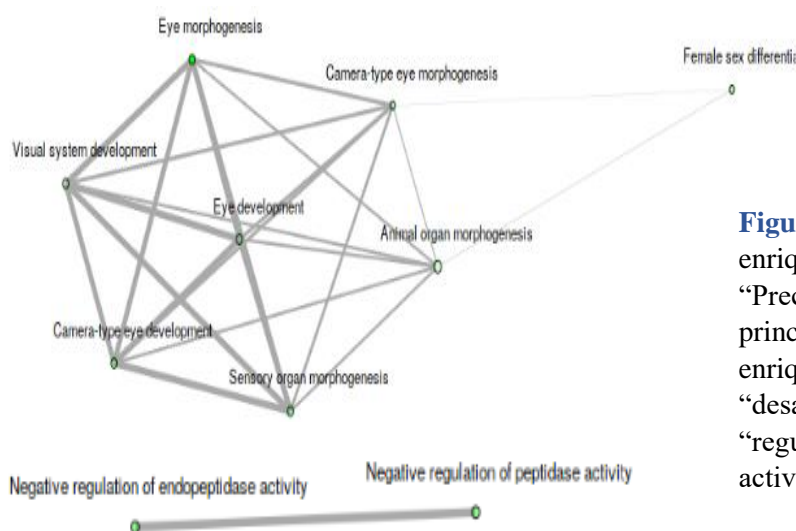


Figura 3. Red de enriquecimiento de ontología “Preclínicos Vs. Control”. Las principales dos vías celulares enriquecidas incluyen “desarrollo de órganos” y “regulación negativa de la actividad endopeptidasa”.

Patología visual (morfogénesis de órganos visuales)

Uno de los signos clínicos de animales con *Scrapie* descrito es la discapacidad visual (72). Son varios los estudios con ovejas infectadas con *Scrapie* que describen el deterioro de la retina, el tronco encefálico, nervio óptico y corteza visual, detectando acumulación PrP^{Sc} en la capa plexiforme, tanto interna como externa, además de en células ganglionares y fibras ópticas (73).

Nuestros resultados de enriquecimiento sugieren la implicación de varios genes en la morfogénesis y desarrollo visual, debiéndose considerar el papel que la alteración en la expresión de éstos toma en la patología. Aunque la discapacidad visual suele aparecer en estadios avanzados de la enfermedad, nuestros resultados sugieren la disfunción de estas vías ya desde fases tempranas en animales preclínicos.

En cuanto a los genes que presentan cambios en su patrón de expresión en animales preclínicos frente al grupo control, *SIX3*, *COL8A1*, *MFRP*, *STRA6* aparecen infra-regulados, mientras que *MYBPC2* y *LHX9* presentan sobre-expresión.

La anotación de estos genes, en particular *SIX3*, *MFRP* y *STRA6*, revela, una vez más, su implicación de la vía de señalización Wnt, fundamental en el desarrollo de tejidos oculares (74). La alteración en los patrones de expresión de estos genes resulta en la desregulación de la vía provocando defectos oculares graves e incluso ceguera. El desarrollo ocular comienza con la formación de precursores en la placa neural anterior con la expresión de factores de transcripción, como *SIX3*, que inhiben la señalización Wnt/B-catenina. *SIX3* previene la activación de la vía Wnt/B-catenina en el prosencéfalo rostral de ratón mediante unión y represión del potenciador de Wnt1. La pérdida de expresión de este factor de transcripción en animales preclínicos, tal y como sugieren nuestros resultados, resultaría en el aumento de la expresión de Wnt1 y alteraciones en la funcionalidad ocular (75). Por otro lado, *MFRP* contiene un dominio rico en cisteínas (CDR), que también se encuentra en el receptor Frizzled, implicado en la ruta de señalización Wnt (76). El dominio CDR es esencial para la unión a proteínas Wnt y su señalización, lo que sugiere la posible alteración de la vía por cambios de expresión en el gen *MFRP*. Aunque la implicación de *MFRP* en la vía Wnt no se conoce con exactitud, varios estudios demuestran la relación entre la pérdida de función de *MFRP* y discapacidad visual. La deficiencia de *MFRP* causa desarrollo ocular anormal con un eje visual irregular y varias comorbilidades visuales (77), lo que explica la alteración en morfogénesis y desarrollo ocular de nuestros resultados de enriquecimiento (**Tabla 5**), así como la disfunción visual que presentan los animales preclínicos.

Por último, *STRA6*, que aparece infra-expresado en animales preclínicos, codifica para un receptor de membrana implicado en el transporte de retinol desde RBP4 (Retinol Binding Protein 4), transfiriéndolo a la proteína citoplasmática RBP1 (Retinol Binding Protein 1). Estudios previos sugieren que Wnt-1 es capaz de inducir la expresión de *STRA6* por un mecanismo sinérgico al del retinol (78). La ausencia de *STRA6*, por infra-expresión del gen, y alteración de la homeostasis de retinol, da lugar a la disminución de células del cono y de la respuesta escotópica y fotópica, además de la reducción del espesor de la retina (79).

Todo ello sugiere la importante implicación de la ruta de señalización Wnt en las vías de nuestros resultados de ontología, incluyendo “Morfogénesis ocular” y “Desarrollo del sistema visual”. La alteración en la expresión de los genes discutidos supone la desregulación de la vía Wnt ya desde el comienzo de la enfermedad, degenerando de forma progresiva hasta el final de la misma, con alteración de *SFRP5* y *GBX2*, tal y como se ha matizado en el apartado anterior (“Clínicos Vs. Control”).

Por otro lado, *COL8A1*, sin implicación en la ruta de señalización Wnt, cumple también un importante papel en la morfogénesis y desarrollo ocular. *COL8A1* codifica para la cadena α -1 del colágeno VIII, componente de la membrana basal del endotelio de la córnea. Estudios de inactivación de *COL8A1* y *COL8A2* en ratones demuestran que el colágeno VIII es necesario para el desarrollo normal de la cámara anterior del ojo. Su ausencia da lugar a una protuberancia globoide en la cámara anterior y reduce el número de células endoteliales de la córnea, además de disminuir la capacidad de proliferación de éstas (80). Se ha sugerido, por tanto, un posible papel del colágeno VIII como factor de crecimiento durante el desarrollo de la córnea. Nuestros resultados, indicativos de la infra-expresión de *COL8A1* en animales preclínicos, podrían sugerir perturbaciones similares a las observadas en ratones KO-*COL8A1*, con una reducción en la proliferación de las células de la córnea, contribuyendo al adelgazamiento de la misma.

Regulación negativa de la actividad endopeptidasa y apoptosis

El enriquecimiento de esta vía metabólica sugiere la alteración de procesos que reducen la tasa de actividad peptidasa, e incluye a los genes *AHSG*, que aparece sobre-expresado, y *NAIP*, *LXN* y *WFIKKN2*, que aparecen infra-expresados.

Entre éstos resulta de especial interés el gen *NAIP*, dada su implicación en la apoptosis. La proteína codificada por este gen contiene regiones de homología con inhibidores de proteínas de apoptosis de Baculovirus y, de igual forma, es capaz de suprimir la apoptosis, mediante inhibición de CASP3, CASP7 y CASP9. *NAIP* inhibe la auto-escisión de pro-CASP9 y escisión de pro-CASP3 por CASP9, lo que explica su implicación en la regulación negativa de actividad endopeptidasa. *NAIP* interviene en la supervivencia neuronal en condiciones patológicas, previniendo la apoptosis de neuronas motoras. Niveles reducidos de *NAIP* sugieren, por tanto, la desregulación de la vía apoptótica y un aumento de la misma, pues la inhibición por *NAIP* no tendría lugar. En relación, son varios los estudios que describen daño dendrítico y muerte neuronal por apoptosis en el periodo de incubación de la enfermedad, tanto *in vivo* como *in vitro* (64) (81).

5.1.3 Implicación de rutas de desarrollo temprano del sistema nervioso

Resulta de especial interés que varios de los genes de nuestros resultados, con implicación en las vías moleculares previamente discutidas y, para ambos grupos muestreados, cumplen un papel importante en el desarrollo temprano del sistema nervioso.

En cuanto a los resultados de expresión diferencial en animales clínicos, respecto a controles, la propia vía canónica de señalización Wnt que, atendiendo a nuestros resultados, predecimos que aparece alterada en animales con *Scrapie*, conduce a la remodelación de los microtúbulos, proceso fundamental en el desarrollo en fases muy tempranas del sistema nervioso. De la misma forma, los factores de transcripción de homeodominio, como *GBX2* y *OTX2*, con expresión diferencial en animales clínicos, son determinantes en el desarrollo embrionario. Por otro lado, la red de interacción de *OTX2* (**Figura 1**) pone de manifiesto la interacción con los genes de pluripotencial *NANOG* y *FOXO2*, implicados, una vez más, en el desarrollo del sistema nervioso, así como las Semaforinas previamente discutidas.

Respecto a los animales preclínicos, *COL8A1*, así como los genes con cambios de expresión implicados en la vía de señalización Wnt discutidos, aparecen implicados en el desarrollo ocular.

En relación, el estudio comparativo de Majer et al (2019) (82) de perfiles de expresión génica en poblaciones de neuronas, microglía y astrocitos procedentes de ratones con enfermedad priónica identifica un enriquecimiento de genes implicados en el desarrollo neuronal, apoyando así nuestras conclusiones.

Todo ello, sorprendentemente, sugiere una significativa alteración en la expresión de genes de desarrollo temprano del sistema nervioso en *Scrapie*. Esta observación nos lleva a realizar una búsqueda de cambios en genes de desarrollo neuronal en otras enfermedades neurodegenerativas que justifiquen nuestros resultados. El análisis comparativo *in silico* de genes con expresión diferencial en Alzheimer, Parkinson, Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) y demencia frontotemporal (83) permite la identificación de rutas enriquecidas comunes entre los cuatro síndromes neurodegenerativos. En relación con nuestros resultados, entre las vías GO biológicas del enriquecimiento de Habib y colaboradores (83), se encuentra “desarrollo celular” y “desarrollo de la guía axonal”. Además, las redes génicas y proteicas construidas para los cuatro síndromes,

revela a *EGFR* como el nodo central más conectado, el cual juega un papel fundamental en la regulación del desarrollo neuronal.

El estudio de Habib y colaboradores, centrado en enfermedades neurodegenerativas, sugiere un posible origen de la neuropatología por alteración de procesos tempranos del desarrollo, aunque la manifestación de éstas se da posteriormente en etapas tardías. Sin embargo, en el caso de *Scrapie*, es necesario entrar en contacto con el prion patológico, lo que sugiere un posible papel de PrP^{Sc} en la alteración de procesos de desarrollo neuronal. Esto nos lleva a plantear la posibilidad de que las distintas variantes PrP^{Sc} pudieran afectar diferencialmente a los eventos tempranos de desarrollo.

Los cambios de expresión diferencial de genes implicados en procesos de desarrollo, tanto en *Scrapie*, como en enfermedades neurodegenerativas, plantea la posible implicación de éstos en estadios patológicos y otros procesos moleculares a lo largo de la vida. Es necesario, por tanto, realizar estudios en profundidad que permitan analizar la influencia de estos genes en procesos de envejecimiento y muerte neuronal.

5.2 Identificación de potenciales biomarcadores tempranos de enfermedad

Los genes susceptibles de considerarse como biomarcadores tempranos de la enfermedad son aquellos con expresión diferencial en las muestras preclínicas frente al grupo control (**Tabla 3, Anexos**).

Entre éstos, se diferencian 4 grupos, en función de su perfil de expresión:

Grupo 1: *LXN, KLK7, SHISA3, STRA6, LTBP2*. Aparecen infra-expresados tanto en la fase preclínica de la enfermedad, como en la clínica.

Grupo 2: *MFRP, KL, TTR, WFIKKN2*. Aparecen infra-expresados únicamente en fases tempranas de la enfermedad. En fase clínica no presentan diferencias respecto al grupo control.

Grupo 3: *AHSG, GRIN3B, TLL6, ZAN, TCTE1, EGR2, SLC14A1*. Aparecen sobre-expresados, tanto en la fase preclínica de la enfermedad, como en la clínica.

Grupo 4: *KITLG, NTNG1, MYBPC2, SPTSSB, GRID2IP, LHX9, CHRNA2*. Aparecen sobre-expresados únicamente en fases tempranas de la enfermedad. En fase clínica no presentan diferencias respecto al grupo control.

Entre éstos, interesan especialmente los genes de los grupos 3 y 4 por aparecer sobre-expresados, lo que facilita su detección. Destacan *AHSG* (Grupo 3), *GRID2IP, LHX9* y *CHRNA2* (Grupo 4), con $\log_{2}FC > 3$ en “Preclínicos Vs. Control”, indicativo del significativo cambio en la expresión entre ambos grupos.

Por otro lado, podríamos predecir que interesan aquellos genes para los que se ha descrito relación con síndromes neurodegenerativos. En este sentido, el análisis bibliográfico de los potenciales biomarcadores identificados sugiere la implicación de varios de ellos con distintas patologías (**Tabla 3, Anexos**), haciendo hincapié en el Alzheimer.

La pérdida de función de *KLK7* fomenta la amiloidosis en ratones modelo con Alzheimer (84) y la deficiencia de *Klotho (KL)* se asocia a envejecimiento acelerado. Además, se han descrito niveles reducidos de *Klotho* en pacientes con Alzheimer y disminución de la concentración de la proteína en líquido cefalorraquídeo de pacientes con esclerosis múltiple

remitente-recurrente. De la misma forma, alteraciones de *Klotho* parecen influenciar el desarrollo de neuronas serotoninérgicas, jugando un papel importante en la depresión senil (85).

Shi y colaboradores (2019) (86) describen la infra-expresión de *AHSG*, especialmente interesante por su cambio de expresión en nuestros resultados ($|\log_{2}FC| > 3$), en modelos de ratón con Alzheimer e hipoperfusión crónica, proponiéndolo como un potencial biomarcador de predicción de la progresión del Alzheimer.

Aunque hasta el momento no se había asociado el gen *TLL6* con ninguna patología humana, en 2015, Zempel y colaboradores describen la relación de *TLL6* con la ganancia de función de Tau, sugiriendo así su implicación en el Alzheimer y otras taupatías (87). Igualmente, la sobre-expresión de *SLC14A1* correlaciona con síndromes neurodegenerativos como Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica esporádica y Parkinson (88).

Por otro lado, estudios GWAS recientes describen la asociación del Alzheimer de inicio tardío con niveles reducidos de TTR en plasma y líquido cefalorraquídeo (89).

Interesan, especialmente, *AHSG* y *SLC14A1* ya que, aparecen sobre-expresados en animales preclínicos, lo que facilita su detección frente a los que están infra-expresados. Los genes previamente discutidos podrían tratarse de potenciales biomarcadores de *Scrapie*, sin embargo, no podrían proponerse como candidatos a biomarcadores de enfermedades priónicas humanas (CJD, insomnio familiar fatal, GSS, Kuru) ya que, al aparecer también alterados en otras patologías humanas, resultaría necesario realizar un diagnóstico diferencial.

5.3 Validación de los cambios de expresión

La puesta a punto por PCR a punto final y electroforesis estándar resulta en la amplificación de 21 de los 28 primers diseñados (**Tabla 2, Anexos**) Los genes *SFRP5*, *SPTBN5*, *PPP1R32*, *GRIN3B*, *MFRP*, *SLC5A5* y *TLL6* se descartaron del análisis, mientras que los otros 21 se estudiaron mediante qRT-PCR. En la prueba inicial por qRT-PCR amplificaron todos los genes, a excepción de *GLP1R*, *CHRNA2*, *MAB21L2*, *TTR* y *SIX3*, que presentaron curvas de fusión anormales, indicativas de la formación de dímeros de primers. Los 16 genes restantes (*PMCH*, *LXN*, *PPP1R17*, *STRA6*, *LHX9*, *GBX2*, *OTX2*, *SLITRK6*, *GRID2IP*, *CYP4B1*, *KRT16*, *AHSG*, *WFIKKN2*, *KL*, *SIX3*, *SLC14A1*) amplificaron correctamente, con curvas de fusión indicativas de una adecuada especificidad de reacción.

Debido al periodo de alerta sanitaria a razón del Covid-19, no ha sido posible validar los genes previamente mencionados mediante qRT-PCR. Para poder obtener resultados concluyentes, sería necesario confirmar los cambios de expresión descritos, así como determinar los niveles de proteína codificada en cerebro, sangre o líquido cefalorraquídeo, frecuentemente empleado como fuente de biomarcadores en enfermedades neurodegenerativas.

6 Conclusiones/conclusions

Los resultados de expresión diferencial del RNAseq y el análisis de las vías celulares de enriquecimiento, atendiendo a su implicación en la neuropatología del *Scrapie*, así como la búsqueda de potenciales biomarcadores tempranos de enfermedad, considerando, además, su implicación en otras enfermedades neurodegenerativas nos permite obtener las siguientes conclusiones:

- Las principales vías celulares alteradas en los animales con *Scrapie* en fase clínica responden a perturbaciones en rutas moleculares implicadas en la morfogénesis y progresión neuronal, como consecuencia de la alteración del flujo autofágico y vía de señalización Wnt. Las rutas alteradas en los animales preclínicos se relacionan con la morfogénesis de órganos visuales, con implicación de la vía de señalización Wnt, y reducción de la actividad endopeptidasa, con muerte neuronal por apoptosis.
- Los animales con *Scrapie* presentan una importante alteración de procesos de desarrollo temprano del sistema nervioso central, de forma similar a lo que ocurre en otras enfermedades neurodegenerativas humanas (Alzheimer, Parkinson, ELA, demencia frontotemporal).
- Se identifican 23 potenciales biomarcadores tempranos de *Scrapie*, de ellos *AHSG*, *GRID2IP*, *LHX9* y *CHRNA2* presentan especial interés por estar fuertemente sobre-expresados en los animales infectados con scrapie en fase preclínica.
- Los biomarcadores de *Scrapie* identificados también en enfermedades neurodegenerativas humanas no podrían proponerse como candidatos a biomarcadores de enfermedades priónicas humanas, resultaría necesario realizar un diagnóstico diferencial.

The enrichment analysis of the most represented pathways among the genes with differential expression, associated with the features of *Scrapie* neuropathology, as well as the reserach for potential early biomarkaers of the disease, lead us to the following conclusions:

- The altered cellular pathways in *Scrapie* respond to disturbances in molecular pathways, which are directly related to changes in the expression of certain genes. Clinical animals show altered morphogenesis and neuronal progression, as a consequence of several changes in the autophagic flux and Wnt signaling pathway. Preclinical *Scrapie* shows altered morphogenesis of visual organs, with changes in the Wnt signaling pathway, and decreased neuropeptidase activity, with neuronal death by apoptosis.
- Animals with *Scrapie* show alteration of developmental processes of the central nervous system, in consistency with what is described for other human neurodegenerative diseases (Alzheimer, Parkinson, ALS, frontotemporal dementia).
- We identified 23 potential early biomarkers of *Scrapie*, of which *AHSG*, *GRID2IP*, *LHX9* and *CHRNA2* are of particular interest as they are strongly over-expressed in animals with *Scrapie* in the preclinical phase.
- The *Scrapie* biomarkers which have also been identified in other human neurodegenerative diseases can't be proposed as biomarkers of human prion diseases, as it would be necessary to carry out a differential diagnosis.

7 Bibliografía

1. *Biology and Genetics of Prions Causing Neurodegeneration*. **Prusiner, S. B.** 1, 2013, Annual Review of Genetics, Vol. 47, págs. 601-603.
2. **Imran M, Mahmood S.** 2011, *Virol J*, Vol. 8, pág. 493.
3. *Collagen VI in healthy and diseased nervous system*. **Gregorio, I., Braghetta, P., Bonaldo, P., Cescon, M.** 6, 2018, *Disease Models & Mechanisms*, Vol. 11.
4. **Badiola Díez, J. J., & Pumarola i Batlle, M.** *Encefalopatías espongiformes transmisibles . s.l. : Mayo Ediciones.*, 2010.
5. *Evidence of Presynaptic Location and Function of the Prion Protein*. **Herms, J., Tings, T., Gall, S., Madlung, A., Giese, A., Siebert, H., Schürmann, P., Windl, O., Brose, N., Kretzschmar, H.** 20, 1999, *The Journal of Neuroscience*, Vol. 19, págs. 8866-8875.
6. *De novo mammalian prion synthesis*. **Benetti, F., & Legname, G.** 4, 2009, *Prion*, Vol. 3, págs. 213-219.
7. *The hydrophobic core region governs mutant prion protein aggregation and intracellular retention*. **Biasini, E., Tapella, L., Restelli, E., Pozzoli, M., Massignan, T., Chiesa, R.** 3, 2010, *Biochemical Journal*, Vol. 430, págs. 477-486.
8. *Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins*. **Pan, K. M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R. J., & Cohen, F. E.** 23, 1993, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 90.
9. *Susceptibility to scrapie and disease phenotype in sheep: cross-PRNP genotype experimental transmissions with natural sources*. **González, Lorenzo, Jeffrey, M., Dagleish, M. P., Goldmann, W., Sisó, S., Eaton, S. L., Martín, S., Finlayson, J., Stewart, P., Steele, P., Pang, Y., Hamilton, S., Reid, H. W., Chianini, F.** 1, 2012, *Veterinary Research*, Vol. 43.
10. *Effects of Agent Strain and Host Genotype on PrP Accumulation in the Brain of Sheep Naturally and Experimentally Affected with Scrapie*. **González, L., Martín, S., Begara-McGorum, I., Hunter, N., Houston, F., Simmons, M., Jeffrey, M.** 1, 2002, *Journal of Comparative Pathology*, Vol. 126, págs. 17-29.
11. *Strain-specified characteristics of mouse synthetic prions*. **Legname, G., Nguyen, H.-O. B., Baskakov, I. V., Cohen, F. E., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B.** 6, 2005, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 102, págs. 2168-2173.
12. *The prion strain phenomenon: Molecular basis and unprecedented features*. **Morales, R., Abid, K., Soto, C.** 6, 2007, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, Vol. 1772, págs. 681-691.
13. *Atypical/Nor98 scrapie: properties of the agent, genetics, and epidemiology*. **Benestad, S. L., Arsac, J.-N., Goldmann, W., Nöremark, M.** 4, 2008, *Veterinary Research.*, Vol. 39.
14. *Apoptosis and dendritic dysfunction precede prion protein accumulation in 87V scrapie.* . **Jamieson, E., Jeffrey, M., Ironside, J. W., & Fraser, J. R.** 10, 2001, *Neuroreport*, Vol. 12, págs. 2147-2153.
15. *Transmission and Detection of Prions in Feces*. **Safar, J. G., Lessard, P., Tamgüney, G., Freyman, Y., Deering, C., Letessier, F., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B.** 1, 2008, *The Journal of Infectious Diseases*, Vol. 198, págs. 81-89.

16. Salivary prions in sheep and deer. **Tamgüney, G., Richt, J. A., Hamir, A. N., Greenlee, J. J., Miller, M. W., Wolfe, L. L., Sirochman, T. M., Young, A. J., Glidden, D. V., Johnson, N. L., Giles, K., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B.** 1, 2012, *Prion*, Vol. 6, págs. 52-61.
17. Disease-associated PrP in the enteric nervous system of scrapie-affected Suffolk sheep. **Heggebo, R., González, L., Press, C. McL., Gunnes, G., Espenes, A., Jeffrey, M.** 5, 2003, *Journal of General Virology*, Vol. 84, págs. 1327-1338.
18. Positioning of follicular dendritic cells within the spleen controls prion neuroinvasion. **Prinz, M., Heikenwalder, M., Junt, T., Schwarz, P., Glatzel, M., Heppner, F. L., Fu, Y.-X., Lipp, M., Aguzzi, A.** 6961, 2003, *Nature*, Vol. 425, págs. 957-962.
19. Neuroanatomical distribution of abnormal prion protein in naturally occurring atypical scrapie cases in Great Britain. **Moore, S. J., Simmons, M., Chaplin, M., Spiropoulos, J.** 5, 2008, *Acta Neuropathologica*, Vol. 116, págs. 547-559.
20. **McManus, L. M., Mitchell, R. N.** *Pathobiology of Human Disease. s.l. : elsevier Gezondheidszorg., 2014.*
21. Review: Update on Classical and Atypical Scrapie in Sheep and Goats. **Greenlee, J. J.** 1, 2018, *Veterinary Pathology*, Vol. 56, págs. 6-16.
22. Failure to detect abnormal prion protein and scrapie-associated fibrils 6 wk after intracerebral inoculation of genetically susceptible sheep with scrapie agent. **Hamir, A. N., Miller, J. M., Stack, M. J., Chaplin, M. J.** 4, 2002, *Canadian Journal of Veterinary Research.*, Vol. 66, págs. 289-294.
23. **Green, A. J. E., & Zanusso, G.** Prion protein amplification techniques. 2018. págs. 357-370.
24. Gene expression profiling of mesenteric lymph nodes from sheep with natural scrapie. **Filali, H., Martín-Burriel, I., Harders, F., Varona, L., Hedman, C., Mediano, D. R., Monzón, M., Bossers, A., Badiola, J. J., Bolea, R.** 1, 2014, *BMC Genomics*, Vol. 15.
25. Molecular classification of scrapie strains in mice using gene expression profiling. **Booth, S., Bowman, C., Baumgartner, R., Dolenko, B., Sorensen, G., Robertson, C., Coulthart, M., Phillipson, C., Somorjai, R.** 4, 2004, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 325, págs. 1339-1345.
26. Differential gene expression and apoptosis markers in presymptomatic scrapie affected sheep. **Hedman, C., Lyahyai, J., Filali, H., Marín, B., Serrano, C., Monleón, E., Moreno, B., Zaragoza, P., Badiola, J. J., Martín-Burriel, I., Bolea, R.** 1-2, 2012, *Veterinary Microbiology*, Vol. 159, págs. 23-32.
27. Gene and protein patterns of potential prion-related markers in the central nervous system of clinical and preclinical infected sheep. **Filali, H., Vidal, E., Bolea, R., Márquez, M., Marco, P., Vargas, A., Pumarola, M., Martín-Burriel, I., Badiola, J. J.** 1, 2013, Vol. 44.
28. Biomarcadores asociados con scrapie y otras encefalopatías espongiiformes transmisibles. **Bolea, R., Filali, H., Martín-Burriel, I., Badiola, J. J.** 1, 2014, *Informacion Tecnica Economica Agraria*, Vol. 110, págs. 49-70.
29. Transcriptomic Determinants of Scrapie Prion Propagation in Cultured Ovine Microglia. **Muñoz-Gutiérrez, J. F., Aguilar Pierlé, S., Schneider, D. A., Baszler, T. V., Stanton, J. B.** 1, 2016, *PLOS ONE*, Vol. 11.
30. The Autophagy–Lysosomal Pathway in Neurodegeneration: A TFEB Perspective. **Martini-Stoica, H., Xu, Y., Ballabio, A., Zheng, H.** 4, 2016, *Trends in Neurosciences.*, Vol. 39, págs. 221-234.

31. *Genomic Profiling: cDNA Arrays and Oligoarrays*. **Gorreta, F., Carbone, W., Barzaghi, D.** 2012, *Methods in Molecular Biology.*, Vol. 823, págs. 89-105.
32. *Gene Expression Profiling and Association with Prion-Related Lesions in the Medulla Oblongata of Symptomatic Natural Scrapie Animals*. **Filali, H., Martín-Burriel, I., Harders, F., Varona, L., Lyahyai, J., Zaragoza, P., Pumarola, M., Badiola, J. J., Bossers, A., Bolea, R.** 5, 2011, *PLoS ONE*, Vol. 6.
33. *Medulla oblongata transcriptome changes during presymptomatic natural scrapie and their association with prion-related lesions*. **Filali, H., Martín-Burriel, I., Harders, F., Varona, L., Serrano, C., Acín, C., Badiola, J. J., Bossers, A., Bolea, R.** 1, 2012, *BMC Genomics*, Vol. 13, pág. 399.
34. *Identification of Differentially Expressed Genes in Scrapie-Infected Mouse Brains by Using Global Gene Expression Technology*. **Xiang, W., Windl, O., Wünsch, G., Dugas, M., Kohlmann, A., Dierkes, N., Westner, I. M., Kretzschmar, H. A.** 20, 2004, *Journal of Virology*, Vol. 78, págs. 11051-60.
35. *Transcriptome analysis of CNS immediately before and after the detection of PrPSc in SSBP/1 sheep scrapie*. **Gossner, A. G., Hopkins, J.** 3-4, 2014, *Veterinary Microbiology*, Vol. 173, págs. 201-207.
36. *RNAseq differential expression analysis: An extended review and a software tool*. **Costa-Silva, J., Domingues, D., Lopes, F. M.** 12, 2017, *PLOS ONE*, Vol. 12.
37. *RNAseq methods for transcriptome analysis*. **Hrdlickova, R., Toloue, M., Tian, B.** 1, 2016, *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, Vol. 8.
38. *MiRNA expression profiles in the brains of mice infected with scrapie agents 139A, ME7 and S15*. **Gao, C., Wei, J., Zhang, B.-Y., Shi, Q., Chen, C., Wang, J., Shi, Q., Dong, X.-P.** 1, 2016, *Emerging Microbes & Infections*, Vol. 5, págs. 1-10.
39. *Identification of circulating microRNA signatures as potential biomarkers in the serum of elk infected with chronic wasting disease*. **Slota, J. A., Medina, S. J., Klassen, M., Gorski, D., Mesa, C. M., Robertson, C., Mitchell, G., Coulthart, M. B., Pritzkow, S., Soto, C., & Booth, S. A.** 1, 2019, *Scientific Reports*, Vol. 9.
40. *Ensembl 2020*. **Andrew D Yates, Premanand Achuthan, Wasiu Akanni, James Allen, Jamie Allen, Jorge Alvarez-Jarreta, M Ridwan Amode, Irina M Armean, Andrey G Azov, Ruth Bennett, and more.**
41. *ShinyGO v0.61: Gene Ontology Enrichment Analysis + more*. **ShinyGO. Ge, S., Jung, D., Yao, R.** 2020.
42. *BioGRID Interaction Database*. **Lab, M. T.** BioGRID.
43. *The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analysis, Current Protocols in Bioinformatics*. **Stelzer G, Rosen R, Plaschkes I, Zimmerman S, Twik M, Fishilevich S, Iny Stein T, Nudel R, Lieder I, Mazor Y, Kaplan S, Dahary D, Warshawsky D, Guan - Golan Y, Kohn A, Rappaport N, Safran M, Lancet D.** 2016.
44. *Protein Bioinformatics Databases and Resources*. **Chen C, Huang H, Wu CH.** 2017, *Methods Mol. Biol.*, Vol. 1558, págs. 3-39.
45. *Primer3 - new capabilities and interfaces*. **Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG.** 15, 2012, *Nucleic Acids Research*, Vol. 40, pág. e115.
46. *Enhancements and modifications of primer design program Primer3*. **Koressaar T, Remm M.** 10, 2007, *Bioinformatics*, Vol. 23, págs. 1289-91.

47. Selection of ovine housekeeping genes for normalisation by real-time RT-PCR; analysis of PrP gene expression and genetic susceptibility to scrapie. **García-Crespo, D., Juste, RA., Hurtado, A.** 3, 2005, *BMC Vet Res*, Vol. 1.
48. Evaluation of Internal Reference Genes for Quantitative Expression Analysis by Real-Time PCR in Ovine Whole Blood. **Peletto, S., Bertuzzi, S., Campanella, C., Modesto, P., Maniaci, MG., Bellino, C., Ariello, D., Quasso,, Caramelli M., Acutis, PL.** 11, 2011, *Int J Mol Sci*, Vol. 12, págs. 7732-47.
49. Dystrophic neurites accumulating autophagic vacuoles show early stages of neuritic destruction. **Liberski, P. P., Gajos, A., Sikorska, B.** 3, 2018, *Folia Neuropathologica*, Vol. 56, págs. 175-178.
50. Abnormal prion protein is associated with changes of plasma membranes and endocytosis in bovine spongiform encephalopathy (BSE)-affected cattle brains. **Ersdal, C., Goodsir, C. M., Simmons, M. M., McGovern, G., Jeffrey, M.** 3, 2009, *Neuropathology and Applied Neurobiology*, Vol. 35, págs. 259-271.
51. Interaction between misfolded PrP and the ubiquitin-proteasome system in prion-mediated neurodegeneration. **Lin, Z., Zhao, D., Yang, L.** 6, 2013, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, Vol. 45, págs. 477-484.
52. Early Delivery of Misfolded PrP from ER to Lysosomes by Autophagy. **Cortes, C. J., Qin, K., Norstrom, E. M., Green, W. N., Bindokas, V. P., Mastrianni, J. A.** 2013, *Journal of Cell Biology*, págs. 1-18.
53. p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation. **Liu, W. J., Ye, L., Huang, W. F., Guo, L. J., Xu, Z. G., Wu, H. L., Yang, C., Liu, H. F.** 1, 2016, *Cellular & Molecular Biology Letters*, Vol. 21, págs. 21-29.
54. **Mizushima, N., Kuma, A.** Autophagosomes in GFP-LC3 Transgenic Mice. *Autophagosome and Phagosome. Methods in Molecular Biology. s.l. : Vojo Deretic*, 2008, Vol. 445, págs. 119-124.
55. Collagen VI at a glance. **Cescon, M., Gattazzo, F., Chen, P., Bonaldo.** 19, 2015, *Journal of Cell Science*, Vol. 128, págs. 3525-3531.
56. Dysregulation of autophagy in the central nervous system of sheep naturally infected with classical scrapie. **López-Pérez, Ó., Otero, A., Filali, H., Sanz-Rubio, D., Toivonen, J. M., Zaragoza, P., Badiola, J. J., Bolea, R., Martín-Burriel, I.** 1911, 2019, *Scientific Reports*, Vol. 9.
57. Recessive Mutations in the $\alpha 3$ (VI) Collagen Gene COL6A3 Cause Early-Onset Isolated Dystonia. **Zech, M., Lam, D. D., Francescato, L., Schormair, B., Salminen, A. V., Jochim, A., Wieland, T., Lichtner, P., Peters, A., Gieger, C., Lochmüller, H., Strom, T. M., Haslinger, B., Katsanis, N., Winkelmann, J.** 6, 2015, *The American Journal of Human Genetics*, Vol. 96, págs. 883-893.
58. Autophagy and Cellular Senescence Mediated by Sox2 Suppress Malignancy of Cancer Cells. **Cho, Y.-Y., Kim, D. J., Lee, H. S., Jeong, C.-H., Cho, E.-J., Kim, M.-O., Byun, S., Lee, K.-Y., Yao, K., Carper, A., Langfald, A., Bode, A. M., Dong, Z.** 2, 2013, *PLoS ONE*, Vol. 8, pág. e57172.
59. FOXO transcription factors: key regulators of cellular quality control. **Webb, A. E., Brunet, A.** 4, 2014, *Trends in Biochemical Sciences*, Vol. 39, págs. 159-169.
60. Ataxin-1 regulates the cerebellar bioenergetics proteome through the GSK3 β -mTOR pathway which is altered in Spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1). **Sánchez, I., Balagué, E., Matilla-Dueñas, A.** 18, 2016, *Human Molecular Genetics*, Vol. 25, págs. 4021-4040.
61.). CDK4 Regulates Lysosomal Function and mTORC1 Activation to Promote Cancer Cell Survival. **Martínez-Carreres, L., Puyal, J., Leal-Esteban, L. C., Orpinell, M., Castillo-Armengol, J., Giralt, A.,**

Dergai, O., Moret, C., Barquissau, V., Nasrallah, A., Pabois, A., Zhang, L., Romero, P., Lopez-Mejia, I. C., Fajas, L. 20, 2019, *Cancer Research*, Vol. 79.

62. *Wnt signaling in axon guidance.* **Zou, Y.** 9, 2004, *Trends in Neurosciences*, Vol. 27, págs. 528-532.

63. *Secreted and Transmembrane Wnt Inhibitors and Activators.* **Cruciat, C.-M., Niehrs, C.** 3, 2012, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, Vol. 5, pág. a015081.

64. *Distinct spatial activation of intrinsic and extrinsic apoptosis pathways in natural scrapie: association with prion-related lesion.* **Serrano, C., Lyahyai, J., Bolea, R., Varona, L., Monleón, E., Badiola, J. J., Zaragoza, P., & Martín-Burriel, I.** 5, 2009, *Veterinary Research*, Vol. 40.

65. *Gbx2 functions as a transcriptional repressor to regulate the specification and morphogenesis of the mid-hindbrain junction in dosage- and stage-dependent manner.* **Nakayama, Y., Kikuta, H., Kanai, M., Yoshikawa, K., Kawamura, A., Kobayashi, K., Wang, Z., Khan, A., Kawakami, K., & Yamasu, K.** 11-12, 2013, *Mechanisms of Development*, Vol. 130, págs. 532-552.

66. *The posteriorizing gene Gbx2 is a direct target of Wnt signalling and the earliest factor in neural crest induction.* **Li, B., Kuriyama, S., Moreno, M., Mayor, R.** 19, 2009, *Development*, Vol. 136, págs. 3267-3278.

67. *The netrin-G1 ligand NGL-1 promotes the outgrowth of thalamocortical axons.* **Lin, J. C., Ho, W.-H., Gurney, A., Rosenthal, A.** 12, 2003, *Nature Neuroscience*, Vol. 6, págs. 1270-1276.

68. *Axonal netrin-Gs transneuronally determine lamina-specific subdendritic segments.* **Nishimura-Akiyoshi, S., Niimi, K., Nakashiba, T., Itohara, S.** 37, 2007, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 104, págs. 14801-14806.

69. *Zic1 levels regulate mossy fiber neuron position and axon laterality choice in the ventral brain stem.* **DiPietrantonio, H. J., Dymecki, S. M.** 3, 2009, *Neuroscience*, Vol. 162, págs. 560-573.

70. *Transcriptional control of axonal guidance and sorting in dorsal interneurons by the Lim-HD proteins Lhx9 and Lhx1.* **Avraham, O., Hadas, Y., Vald, L., Zisman, S., Schejter, A., Visel, A., Avihu, K.** 1, 2009, *Neural Development*, Vol. 4, pág. 21.

71. **Koncina, E., Roth, L., Gonthier, B., Bagnard, D.** *Role of Semaphorins during Axon Growth and Guidance.* *Axon Growth and Guidance. Advances in Experimental Medicine and Biology.* s.l. : Bagnard D, 2007, Vol. 621.

72. **Craighead, J.** *Pathology and Pathogenesis of Human Viral Disease.* s.l. : Academic Press, 2000.

73. *Clinical, electroretinographic and histomorphometric evaluation of the retina in sheep with natural scrapie.* **Regnier, A., Andreoletti, O., Albaric, O., Gruson, D., Schelcher, F., Toutain, P.-L.** 25, 2011, *BMC Veterinary Research*, Vol. 7.

74. *Wnt signaling in eye organogenesis.* **Fuhrmann, S.** 2, 2008, *Organogenesis*, Vol. 4, págs. 60-67.

75. *Six3 repression of Wnt signaling in the anterior neuroectoderm is essential for vertebrate forebrain development.* **Lagutin, O. V.** 3, 2003, *Genes & Development*, Vol. 17, págs. 368-379.

76. *Mfrp, a gene encoding a frizzled related protein, is mutated in the mouse retinal degeneration 6.* **Kameya, S.** 16, 2002, *Human Molecular Genetics*, Vol. 11, págs. 1879-1886.

77. *Gene Therapy Restores Mfrp and Corrects Axial Eye Length.* **Velez, G., Tsang, S. H., Tsai, Y.-T., Hsu, C.-W., Gore, A., Abdelhakim, A. H., Mahajan, M., Silverman, R. H., Sparrow, J. R., Bassuk, A. G., Mahajan, V. B.** 16151, 2017, *Scientific Reports*, Vol. 7.

78. *Overexpression of the retinoic acid-responsive gene Stra6 in human cancers and its synergistic induction by Wnt-1 and retinoic acid.* Szeto, W., Jiang, W., Tice, DA., Rubinfeld, B., Hollinshead, PG., Fong, SE., Dugger, DL., Pham, T., et al. 10, 2001, *Cancer Res*, Vol. 61, págs. 4197-4205.
79. *Retinoid Content, Visual Responses, and Ocular Morphology Are Compromised in the Retinas of Mice Lacking the Retinol-Binding Protein Receptor, STRA6.* Ruiz, A., Mark, M., Jacobs, H., Klopfenstein, M., Hu, J., Lloyd, M., Habib, S., Tosha, C., Radu, R. A., Ghyselinck, N. B., Nusinowitz, S., Bok, D. 6, 2012, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, Vol. 53, págs. 3027-3039.
80. *Targeted disruption of Col8a1 and Col8a2 genes in mice leads to anterior segment abnormalities in the eye.* Hopfer, U., Fukai, N., Hopfer, H., Wolf, G., Joyce, N., Li, E., Olsen, B. R. 10, *The FASEB Journal*, Vol. 19, págs. 1232-1244.
81. *Apoptosis and dendritic dysfunction precede prion protein accumulation in 87V scrapie.* Jamieson, E., Jeffrey, M., Ironside, J. W., Fraser, J. R. 10, 2001, *Neuroreport*, Vol. 12, págs. 2147-2153.
82. *The cell type resolved mouse transcriptome in neuron-enriched brain tissues from the hippocampus and cerebellum during prion disease.* Majer, A., Medina, S. J., Sorensen, D., Martin, M. J., Frost, K. L., Phillipson, C., Manguiat, K., Booth, SA. 1099, 2019, *Scientific Reports*, Vol. 9.
83. *Decoding Common Features of Neurodegenerative Disorders: From Differentially Expressed Genes to Pathways.* Habib R, Noreen N, Nadeem N. 4, 2012, *Curr Genomics*, Vol. 19, págs. 300-312.
84. *Loss of kallikrein-related peptidase 7 exacerbates amyloid pathology in Alzheimer's disease model mice.* Kidana, K., Tatebe, T., Ito, K., Hara, N., Kakita, A., Saito, T., Takatori, S., Ouchi, Y., Ikeuchi, T., Makino, M., Saido, T. C., Akishita, M., Iwatsubo, T., Hori, Y., Tomita, T. 3, 2018, *EMBO molecular medicine*, Vol. 10, pág. e8184.
85. *Klotho at the Edge of Alzheimer's Disease and Senile Depression.* Paroni, G., Panza, F., De Cosmo, S., Greco, A., Seripa, D., Mazzocchi, G. 3, 2018, *Molecular Neurobiology*, Vol. 56, págs. 1908-1920.
86. *Acute Anti-Inflammatory Markers ITIH4 and AHSR in Mice Brain of a Novel Alzheimer's Disease Model.* Shi, X., Ohta, Y., Liu, X., Shang, J., Morihara, R., Nakano, Y., Feng, T., Huang, Y., Sato, K., Takemoto, M., Hishikawa, N., Yamashita, T., Abe, K. 4, 2019, *Journal of Alzheimer's Disease*, Vol. 68, págs. 1667-1675.
87. *Tau missorting and spastin-induced microtubule disruption in neurodegeneration: Alzheimer Disease and Hereditary Spastic Paraplegia.* Zempel, H., Mandelkow, EM. 68, 2015, *Mol Neurodegeneration*, Vol. 10.
88. *Gene networks in neurodegenerative disorders.* Recabarren, D., Alarcón, M. 2017, *Life Sci.*, Vol. 183, págs. 83-97.
89. *Large-scale genoma-wide enrichment analyses identify new trait-associated genes and pathways across 31 human phenotypes.* Zhu X, Stephens M. 4361, 2018, *Nature*, Vol. 9.
90. *McManus, L. M., Mitchell, R. N. Pathobiology of Human Disease. s.l. : Elsevier Gezondheidszorg., 2014.*
91. *InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams.* Heberle, H., Meirelles, G. V., da Silva, F. R., Telles, G. P., Minghim, R. 1, 2015, *BMC Bioinformatics*, Vol. 16, pág. 169.