

Análisis proteico diferencial del colículo inferior en el modelo de epilepsia experimental GASH/Sal

Tesis doctoral de

José Ramón del Bosque Arín

Directores

Consuelo Sancho Sánchez

Ricardo Gómez Nieto

Laboratorio de Trastornos Audiomotores
Instituto de Neurociencias de Castilla y León (INCyL)
Universidad de Salamanca
Salamanca, 2022

Este trabajo ha sido realizado gracias a los proyectos cofinanciados con fondos de la Unión Europea: concedidos por el Instituto de Salud Carlos III (#PI19/01364, IPs: Dolores E. López and Ricardo Gómez-Nieto), por la Consejería de educación de la Junta de Castilla y León (# SA075P20, IP: Dolores E. López) y la Universidad de Salamanca (Programa XIII- 2017-2022).

A las mujeres de mi vida, mi madre, mi esposa y mi hija. Sin ellas no sería quien soy.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1 Epilepsia.....	9
1.2 Núcleos desencadenantes de las convulsivas audiógenas.....	11
1.3 El modelo animal de epilepsia audiógena GASH/Sal.	12
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	14
3. MATERIALES Y METODOLOGÍA	17
3.1 Diseño experimental.....	18
3.2 Animales experimentales	18
3.3 Obtención de muestras	20
3.4 Técnicas empleadas.....	20
3.4.1 Estandarización de la extracción de proteínas	20
3.4.2 Valoración proteica	22
3.4.3 Electroforesis bidimensional	22
3.4.4 DIGE.....	23
3.4.5 SDS-PAGE-MS.....	24
3.4.6 SHOTGUN.....	25
3.4.7 iTRAQ-8	26
3.4.8 RT-qPCR	28
3.5 Análisis de los resultados.....	31
3.5.1 Identificación de proteínas	31
3.5.2 Análisis bioinformático.....	33
3.5.3 Localización subcelular de las proteínas.....	34
3.5.4 Análisis comparativos	34
4. RESULTADOS	35
4.1 Diferencias proteicas del CI entre el hámster control y el GASH/Sal en condiciones basales.....	36
4.1.1 Electroforesis bidimensional	37
4.1.2 SDS-PAGE-MS.....	41
4.1.2.1 Descripción de proteínas diferencialmente expresadas.....	41

4.1.2.2	Análisis de enriquecimiento funcional	45
4.1.3	SHOTGUN.....	48
4.1.3.1	Descripción de proteínas diferencialmente expresadas.....	48
4.1.3.2	Análisis de enriquecimiento funcional	54
4.1.4	iTRAQ-8.....	58
4.1.4.1	Descripción de proteínas diferencialmente expresadas.....	58
4.1.4.2	Análisis de enriquecimiento funcional	60
4.2	Diferencias proteicas del CI entre el hámster control y el GASH/Sal en condiciones basales y tras las crisis convulsivas. DIGE.....	63
4.3	Análisis proteómico comparativo	66
4.3.1	Ortólogos encontrados en la especie <i>Homo sapiens</i>	66
4.3.2	Proteínas comunes	67
4.3.3	Análisis comparativo de los tres métodos.....	69
4.4	Expresión génica en el colículo inferior de las proteínas diferencialmente expresadas	70
5.	DISCUSIÓN.....	72
5.1	Discusión metodológica.....	73
5.2	Discusión de resultados	74
6.	CONCLUSIONES	81
7.	BIBLIOGRAFÍA	83
8.	ABREVIATURAS	95
9.	ANEXOS	98
1.	Permisos del Comité de Bioética.....	99
2.	Resultados SHOTGUN.....	101
3.	Listado de genes citados en el texto	113
4.	Artículo publicado	122

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Epilepsia

El término epilepsia deriva del griego “epilambaneim”, que significa sorprender, ser agarrado, atacado. La epilepsia es un trastorno neurológico crónico que afecta al 1% de la población incluyendo personas de todas las edades. Se define conceptualmente en 2005 como un trastorno del cerebro caracterizado por una predisposición permanente para generar ataques epilépticos (Fisher et al., 2014). La comunicación entre neuronas se regula a través de un equilibrio entre señales inhibitorias y excitatorias, y cuando este equilibrio sufre alteraciones, ya sea por sobreexcitación o por reducción de la inhibición, pueden producirse descargas descontroladas de impulsos excitatorios que producen, en último término una crisis epiléptica. En estos desórdenes cerebrales se produce una descarga hipsincrónica, repentina y temporal de un grupo de neuronas del sistema nervioso central, y que puede constituir un desorden intrínseco del cerebro de carácter hereditario, o surgir tras un daño previo al mismo como un trauma, un tumor o un aneurisma (Avanzini et al., 2012; Ono et al., 2012). Las descargas pueden producirse en diferentes partes del cerebro originando convulsiones que pueden ir desde episodios muy breves de ausencia o de contracciones musculares hasta convulsiones prolongadas y graves con pérdida de consciencia y del control de esfínteres.

La Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE, por sus siglas en inglés) define las crisis epilépticas como un acontecimiento ictal que representa un mecanismo fisiopatológico y sustrato anatómico único; en este sentido, se trata de una entidad diagnóstica con implicaciones etiológicas, terapéuticas y pronósticas (Engel, 2001). Aunque en 2005 junto con la organización “International Bureau for Epilepsy”, proponen como definición alternativa aquella que habla de un acontecimiento transitorio de signos y/o síntomas debidos a una actividad neuronal cerebral anormal excesiva o síncrona (Fisher et al., 2005), en 2014 la ILAE (Fisher et al., 2014) propuso que la epilepsia fuera considerada una enfermedad cerebral definida por una de estas tres condiciones:

1. Al menos dos crisis epilépticas no provocadas (o reflejas) que ocurran en un plazo superior a 24 horas.
2. Una crisis epiléptica no provocada (o refleja) y un riesgo de presentar nuevas crisis similar al derivado tras tener dos crisis no provocadas (de al menos un 60% de probabilidad de recurrencia en los próximos 10 años).
3. Cuando se diagnostica un síndrome epiléptico la definición presenta aspectos muy relevantes tales como la definición de epilepsia como enfermedad o la posibilidad de diagnosticarla tras una primera crisis, sin esperar a una segunda como era la pauta hasta ahora, tras una adecuada evaluación del riesgo de nuevas crisis o recurrencias. Especial atención se ha dedicado a las crisis reflejas que al ser consideradas provocadas podían no ser computadas a la

hora de diagnosticar la epilepsia. La inclusión de estas crisis reflejas, especialmente las fotosensibles, en una definición clínica y práctica de epilepsia “incluye a estos individuos en la comunidad de la epilepsia”.

Al ser tan diverso, el diagnóstico del tipo específico de epilepsia es fundamental para que se utilice una terapia adecuada en cada caso. Este diagnóstico parte de la clasificación de las crisis que presenta el paciente (Scheffer et al., 2017). Según el informe oficial de la Comisión de Clasificación y Terminología de la ILAE, publicado en 2017, las crisis epilépticas deben clasificarse según el patrón de comportamiento y, cuando esté disponible, el registro electroencefalográfico (EEG). Luego, las crisis se clasifican con base en su inicio, en: focales, con las crisis originadas en redes limitadas a un hemisferio; generalizadas, con el rápido reclutamiento de redes distribuidas entre ambos hemisferios; o desconocidas si se desconoce su punto de partida. Opcionalmente, esta clasificación puede incluir otras características de la crisis, como el grado de percepción y la presencia, o ausencia, de automatismos motores. Las convulsiones focales se subdividen en convulsiones motoras y no motoras y convulsiones perceptivas y perceptivas, en las que hay, respectivamente, deterioro o falta de conciencia. En el caso de las convulsiones generalizadas, la percepción siempre está comprometida, sin embargo, aún pueden subdividirse en motoras o no motoras (convulsiones de ausencia) (Fisher et al., 2017). Esta clasificación se utiliza luego como base para definir el tipo de epilepsia que tiene el individuo, que puede ser: desconocida, focal (unifocal o multifocal), generalizada o combinada focal y generalizada (Scheffer et al., 2017). Aproximadamente el 6% de las epilepsias se encuadran dentro del tipo de epilepsias reflejas (Salas-Puig et al., 1994).

Las epilepsias reflejas son aquellas desencadenadas por un estímulo sensorial, como un destello luminoso (epilepsia fotogénica o fotosensible según la duración del estímulo), un estímulo sonoro fuerte y repentino (epilepsia de sobresalto), la toma de decisión espacial (crisis praxis inducidas) o un sonido: epilepsia audiógena refleja. (Salas-Puig et al., 2000), en la que nos centraremos a partir de ahora.

La epilepsia audiógena refleja a lo largo de la historia ha sido en ocasiones denominada como “epilepsia musicogénica” o “epilepsia inducida por la voz”. Según la clasificación descrita por la ILAE 1988, las crisis convulsivas audiógenas (CCA) son generalizadas (no asociadas a una región específica del cerebro, en las que se ven afectados ambos hemisferios) inducidas por la exposición a una estimulación auditiva intensa. Los individuos propensos a padecer CCA presentan estos eventos en forma de crisis clónicas o tónico clónicas (Ross y Coleman, 2000), y los animales que sufren CCA presentan un patrón similar en el desarrollo de sus crisis (Carballosa, 2008).

Al igual que las crisis fotosensibles, se engloban en la categoría de crisis del tronco del encéfalo (Barrios, 2008). Para el estudio de las epilepsias reflejas son muy útiles los estudios con modelos animales, ya que se puede conseguir que se desencadene una crisis exponiendo al animal al estímulo externo que la causa.

1.2 Núcleos desencadenantes de las crisis convulsivas audiógenas

Durante años, se ha intentado identificar el sustrato anatómico responsable de las crisis audiogénicas. Debido a la naturaleza del estímulo desencadenante, la vía auditiva juega un papel crucial en las CCA. Diversos autores han sugerido que el sustrato responsable de la susceptibilidad a las convulsiones podría ser el colículo inferior (CI) (Kesner, 1966; Willott y Lu, 1980 y Browning, 1986), y que, al desencadenarse varias crisis, este foco podría reclutar otras áreas (transformándolas en focos secundarios) de las zonas superiores (Cairasco, 2002; Pereira y Cairasco, 2003). En favor de esta hipótesis está el hecho de que la destrucción bilateral del CI en modelos murinos de crisis audiogénicas elimina las crisis (Kesner, 1966; Browning, 1986) y cuando se aplica estimulación electroquímica en esta estructura, se generan las crisis (Wada et al., 1970).

Estudios electrofisiológicos en ratones de la cepa DBA (susceptibles a padecer crisis audiógenas) indican anormalidades en la respuesta neuronal del CI restringidas principalmente a la porción ventral del núcleo central del CI, que se corresponde con la porción auditiva. Además, se ha comprobado que la estimulación eléctrica o química del CI desencadena crisis epilépticas (McCown et al., 1984). Otros autores han inyectado en el CI aminoácidos que actúan como neurotransmisores inhibitorios, como glicina y taurina, observando también una inhibición de las crisis (Huxtable y Laird, 1978). Por tanto, es clara la implicación del CI en la generación de las crisis convulsivas, y que los diferentes subnúcleos del mismo (núcleo central, corteza dorsal, núcleo intercolicular y corteza externa) intervienen en el desencadenamiento y propagación de las CCA (de Cabo et al., 2006).

El esquema mayoritariamente aceptado de los diferentes núcleos cerebrales implicados en el desencadenamiento de estas crisis fue postulado por Faingold en 2004 (Figura 1).

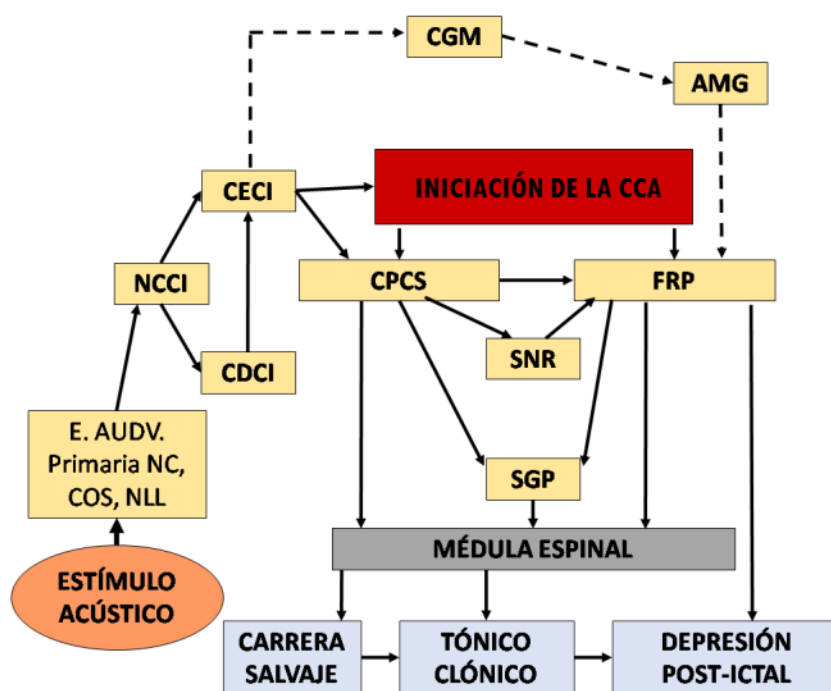


Figura 1. Esquema de los núcleos implicados en el desencadenamiento de las crisis convulsivas audiogénicas y los comportamientos que subyacen a la crisis (Modificado de Faingold, 2004). Cada aspecto comportamental está controlado por un núcleo específico durante la crisis: El NCCI inicia la CCA mientras que la CECI proyecta la señal auditiva hacia los núcleos motores. La capa profunda del colículo superior inicia la carrera salvaje mientras que la SGP y la FRP controlan el desencadenamiento de la fase tónico-clónica. La amígdala y el cuerpo geniculado medial están relacionados con las CCA repetitivas (*Kindling*). Abreviaturas: AMG: amígdala; CCA: crisis convulsivas audiogénicas; CDCI: corteza dorsal del colículo inferior; CECI: corteza externa del colículo inferior; CGM: cuerpo geniculado medial; COS: complejo olivar superior; CPCS: capas profundas del colículo superior; FRP: formación reticular pontina; NC: núcleo coclear; NCCI: núcleo central del colículo inferior; NLL: núcleo del lemnisco lateral; SNR: porción reticular de la sustancia negra; SGP: sustancia gris periacueductal.

1.3. El modelo animal de epilepsia audiogénica GASH/Sal.

Los modelos animales son fundamentales para comprender los mecanismos implicados en la génesis, establecimiento y progresión de patologías, además de su importancia en la detección de nuevos fármacos anticonvulsivos y para evaluar sus efectos en el cerebro y el comportamiento (Löscher, 2011, 2017). Dado que las epilepsias son muy diversas en etiología, las diferencias entre los protocolos de inducción de convulsiones son extremadamente importantes para ayudar a comprender las alteraciones neuronales asociadas con cada tipo de inducción de convulsiones y, en consecuencia, sus aplicaciones clínicas (Löscher, 2017). Las convulsiones audiogénicas son inducidas por una estimulación sonora intensa (~100-120 dB) en animales susceptibles, y se utilizan para estudiar los mecanismos relacionados con las epilepsias, como las vías neuronales y las alteraciones endógenas asociadas con la susceptibilidad a las convulsiones (García-Cairasco et al., 2017).

Las cepas de animales con susceptibilidad audiogénica se utilizan ampliamente para el estudio de las epilepsias en todo el mundo (Ross and Coleman, 2000). Los modelos genéticos *in vivo* de epilepsia más utilizados y bien caracterizados son aquellas especies animales

genéticamente predispuestas, en las que se producen convulsiones en respuesta a la estimulación acústica de alta intensidad, los llamados modelos de epilepsia audiógena (Ross and Coleman, 2000; Komsuoglu Celikyurt et al., 2016). Estos modelos presentan convulsiones generalizadas que se producen en el mesencéfalo de forma reproducible con la exposición a un estímulo sonoro de alta intensidad (Maxson y Cowen, 1976).

En este contexto, los animales de la línea GASH/Sal (Genetic Audiogenic Seizure Hamster, Salamanca) constituyen uno de los modelos animales para el estudio de las epilepsias que están disponibles en nuestro centro de investigación. Los animales GASH/Sal se originaron a partir de un primer hámster epiléptico que apareció de manera espontánea en una cepa endogámica de *Mesocricetus auratus*, en la Universidad de Valladolid (la línea GPG/Vall). Esta línea fue transferida a la Universidad de Salamanca donde finalmente se desarrolló la cepa GASH/Sal como modelo experimental para el estudio de la epilepsia. Esta línea de hámsteres presenta algunas diferencias genéticas con los hámsteres dorados normales (Díaz-Casado et al., 2020), ha sido validado farmacológicamente (Barrera-Bailón et al., 2013 y 2017) y se ha comprobado que cuando recibe estimulación acústica intensa sufre verdaderas crisis epilépticas (Carballosa-González et al., 2013). Se ha observado una desregulación génica en el CI de los animales GASH/Sal en comparación con los hámsteres control, con lo que se sugiere que las convulsiones audiogénicas se desencadenan en los hámsteres GASH/Sal a través de múltiples sustratos moleculares que activan varios procesos biológicos y vías metabólicas asociadas con eventos epileptogénicos similares a los producidos por las convulsiones tónico-clónicas en humanos (López-López et al., 2017; Díaz-Rodríguez et al., 2020). El modelo GASH/Sal podría ayudar a identificar y caracterizar genes y vías que se asocian con convulsiones, lo que podría servir para una mejor comprensión de la génesis y progresión de las epilepsias, así como para el desarrollo de fármacos antiepilépticos. La línea de hámster GASH/Sal es idónea para este tipo de estudios ya que sufre CCA en respuesta a estimulación acústica intensa (Muñoz et al., 2017; Prieto-Martín et al., 2012). Se confirmó que esta línea de animales era un modelo apropiado para el estudio de la epilepsia mediante registros EEG sincronizados con la grabación de video, confirmando un patrón característico de epilepsia generalizada de tipo tónico clónica, estando el CI implicado en el inicio y/o la propagación de las CCA (Carballosa, 2008).

Además, la línea de hámsteres GASH/Sal ha sido validada como un modelo de epilepsia desde el punto de vista comportamental (Muñoz et al., 2017) y farmacológico (Barrera-Bailón, 2013, 2017). Estudios genéticos previos han demostrado que la línea GASH/Sal exhibe variantes génicas, de las cuales, 21 han sido clasificadas como mutaciones de alto impacto (Díaz-Casado et al., 2020).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La epilepsia es un trastorno neurológico crónico caracterizado por una actividad neuronal anormal que surge de desequilibrios entre las sinapsis excitatorias e inhibitorias, que están altamente correlacionadas con cambios funcionales y estructurales en regiones específicas del cerebro. La diferencia entre el cerebro normal y el epiléptico puede albergar cambios genéticos, cambios en la expresión génica y/o alteraciones proteicas en el núcleo epileptógeno.

Cada vez es más claro que tales diferencias contribuyen al desarrollo de los distintos fenotipos de epilepsia.

Los principales desafíos en la investigación sobre epilepsia incluyen comprender la progresión de la enfermedad y aclarar las distintas manifestaciones de la epilepsia mediante la búsqueda de nuevos biomarcadores moleculares. En este sentido, la aplicación de técnicas moleculares para llevar a cabo estudios exhaustivos sobre los ácidos nucleicos (DNA y RNA) y los niveles de proteínas es de suma importancia para dilucidar las disregulaciones moleculares en el cerebro epiléptico.

El presente trabajo se basa en la diversidad de enfoques técnicos disponibles para estudiar alteraciones proteicas subyacentes a la epilepsia. La proteómica, con sus fortalezas y limitaciones, proporciona una valiosa información sobre los mecanismos moleculares subyacentes a la susceptibilidad a las convulsiones y a la regulación de la excitabilidad neuronal. Hemos focalizado el estudio en el análisis de los cambios proteicos existentes en el núcleo epileptógeno del modelo de epilepsia existente en la Universidad de Salamanca, el hámster con convulsiones audiógenas GASH/Sal. Los resultados podrían ser claves para determinar los mecanismos de susceptibilidad a las convulsiones y a la epileptogénesis, así como ofrecer pistas sobre potenciales dianas de nuevos agentes antiepilépticos.

Los objetivos son los siguientes:

Objetivos generales:

Estudiar las diferencias proteicas en el núcleo desencadenante de las crisis epilépticas en el modelo GASH/Sal en relación con el hámster control, para determinar si esta característica diferencial es responsable de las crisis convulsivas.

Contribuir a la estandarización del GASH/Sal como modelo de epilepsias reflejas, y así aumentar el conocimiento de la fisiopatología de esta enfermedad.

Como objetivos específicos hemos propuesto los siguientes:

Objetivo 1: Analizar las diferencias proteicas del CI entre el hámster control y el GASH/Sal en condiciones basales.

Objetivo 2: Encontrar anotaciones funcionales (GO) de los genes que las codifican y ver rutas metabólicas de las proteínas diferencialmente expresadas.

Objetivo 3: Realizar análisis de interacción entre las proteínas analizadas

Objetivo 4: Confirmar por análisis de expresión génica (RT-qPCR) las proteínas más significativas.

Objetivo 5: Estudiar la implicación de las proteínas diferenciales en la epileptogénesis.

3- MATERIALES Y METODOLOGÍA

3.1 Diseño experimental

Para estudiar la diferencia proteica existente en el CI del hámster GASH/Sal con respecto al hámster control, se aislará este núcleo en animales no sometidos a protocolo de estimulación acústica para el desencadenamiento de las crisis (condiciones basales) y en animales sometidos a dicho protocolo de desencadenamiento de crisis audiogénicas. Tras la elección del método de extracción proteico, se evaluará la cantidad de proteína y se realizarán análisis comparativos del contenido proteico en ambos paradigmas experimentales mediante distintas técnicas a uno y otro grupo, en condiciones basales y de estimulación acústica.

El diseño experimental planteado para el abordaje de los objetivos propuestos que hemos planteado es el siguiente:

- Búsqueda bibliográfica para recopilar antecedentes y conocer el estado actual del tema de investigación.
- Estimulación sonora para provocar las crisis audiogénicas en animales GASH/Sal. Los animales controles se someten las mismas manipulaciones que los animales GASH/Sal, incluido el protocolo de estimulación acústica para la provocación de las crisis.
- Extracción del CI en hámsteres GASH/Sal y controles, tanto en el grupo sometidos a protocolo de provocación de crisis audiogénicas como el no sometido a dicho protocolo. Tras la preparación adecuada de la muestra, se realiza una valoración proteica, una separación de proteínas y un análisis diferencial por espectrometría de masas.
- Identificación de los compuestos en bases de datos, con los filtros estadísticos correspondientes.
- Análisis bioinformáticos de las proteínas diferencialmente expresadas: análisis diferencial de significación de proteínas, análisis GO de los genes que las codifican, rutas metabólicas de las proteínas diferencialmente expresadas, análisis de interacción proteica y análisis de localización subcelular.

Un esquema del diseño experimental se puede apreciar en la figura 2.

3.2 Animales experimentales

Para este estudio se han utilizado dos líneas de hámsteres sirios (*Mesocricetus auratus*); por un lado los hámsteres con susceptibilidad convulsiva audiogénica GASH/Sal (Muñoz et al., 2017), que fueron suministrados por la Universidad de Salamanca y por otro, hámsteres dorados de cepa silvestre Lak:LVG (SYR)BR procedentes de Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France) que fueron utilizados como controles.

Los animales fueron estabulados en el animalario del Instituto de Neurociencias de Castilla y León (INCYL) en régimen de alimentación *ad libitum* con Formulab Chow 50008 (Purina

Mills, Inc, Richmond, IN, EEUU) y biberones de agua dispuestos en las mismas cajas. Se alojaron en jaulas estándar en la U.E. tipo III de policarbonato (Tecniplast, Italia) en ambiente controlado con 15 renovaciones/ hora; 30-70% de humedad relativa; 19-23 °C de temperatura y fotoperiodo de 14 horas luz/10 horas oscuridad. Los animales fueron cuidados por personal especializado, según recomendaciones de FELASA (Federación europea de asociaciones de animales de laboratorio) siguiendo la legislación vigente (RD 1201/2015) y las recomendaciones del convenio europeo para la protección de animales vertebrados utilizados en experimentación y otros fines científicos (2010/63/CE).

Se emplearon un total de 62 animales GASH/Sal y 54 controles, todos machos con edades entre 3 y 4 meses de edad.

El diseño experimental y los procedimientos empleados para este trabajo fueron aprobados por el Comité de Bioética de la USAL (aprobación número 300 y 375, ANEXO 1).

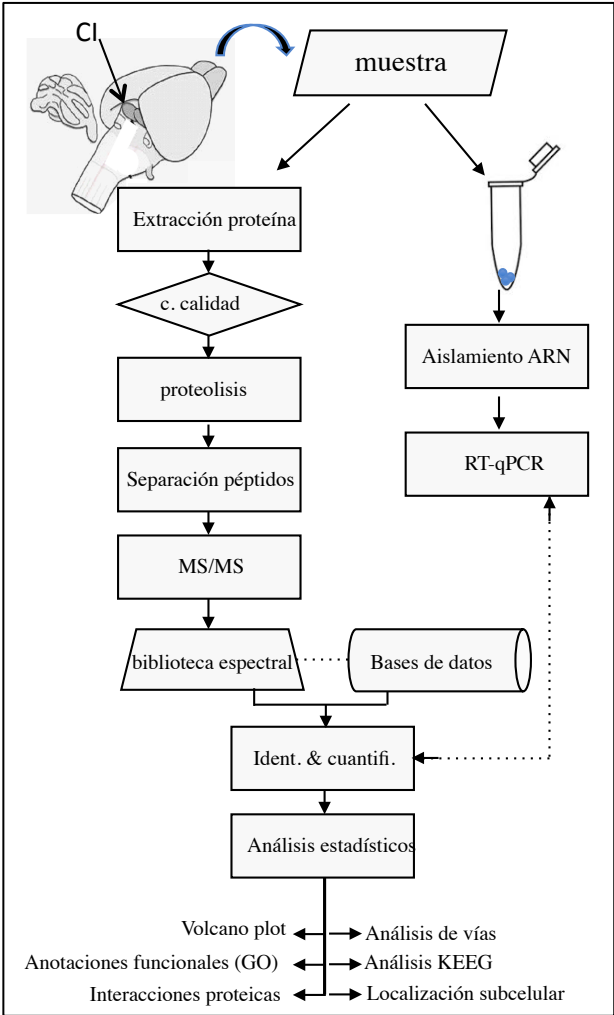


Figura 2. Esquema del diseño experimental seguidos para la elaboración del trabajo y la consecución de los objetivos previstos a desarrollar.

La distribución de animales empleados por técnica se muestra en la tabla 1.

Técnica	N° GASH/Sal	N° Controles
Estandarización extracción proteínas	8	-
Electroforesis bidimensional	12	12
DIGE	6	6
SHOTGUN	4	4
SDS	5	5
iTRAQ-8	9	9
RT-qPCR	18	18

Tabla 1. Distribución de animales empleados por técnica

3.3 Obtención de muestras

Tras hipoxia con CO₂ y comprobada la arreflexia, todos los animales fueron decapitados con una guillotina y, rápidamente en frío, se extrajo el encéfalo de la cavidad ósea. Con la ayuda de un bisturí y sobre un lecho de hielo picado, seccionamos el colículo inferior y otras estructuras cerebrales (colículo superior, el tronco del encéfalo, hipocampo y cerebelo). Las muestras de CI fueron homogeneizadas en un sonicador (Soniprep 150, MSE) y se centrifugaron a 15.000 r.p.m. en una centrífuga (Hettich Mod. EBA12). A continuación, se extrajo el sobrenadante con una pipeta Pasteur y el botón de precipitado se guardó para medir posteriormente las proteínas. El resto de las muestras se congelaron a -70°C para posteriores experimentos.

3.4 Técnicas empleadas

Se han empleado diversas técnicas de valoración proteica desde el inicio del trabajo, dependiendo de los recursos disponibles en cada momento. De forma resumida, describiremos las principales metodologías empleadas.

3.4.1 Estandarización de la extracción de proteínas

Se probaron diferentes métodos de extracción proteica

1- Para la electroforesis bidimensional.

Para la extracción de proteínas, en primer lugar, se trituró el tejido en un mortero con nitrógeno líquido. Seguidamente se añadió una solución de lisado [20% (w/v) tricloroacético: 0,2% (w/v) ditiotretol (DTT) (solvente acetona)]. Se procedió a una incubación a -20°C (una noche). Después se llevó a cabo una centrifugación a 15.000 g, a 4°C, durante 20 min y se eliminó el sobrenadante.

El pellet fue resuspendido con 0,2% (w/v) DTT (solvente acetona fría) y se centrifugó a 15.000 g, a 4°C, durante 15 min y se retiró sobrenadante (este proceso fue repetido tres veces). Una vez se eliminaron los restos de acetona mediante secado por liofilización, el pellet se solubilizó en una solución de rehidratación [(9 M urea; 1% DTT; 2% 3-(cloroamido propil)-dimetilamonio-1-propanosulfato (CHAPS)] (aproximadamente 50 µL por mg de pellet seco).

2- Para técnica DIGE (Electroforesis diferencial cuantitativa con tinción fluorescente).

La técnica de electroforesis diferencial en gel (DIGE, del inglés “differential in gel electrophoresis”) permite el análisis comparativo de la expresión diferencial de proteínas. Para la aplicación de esta técnica, se utilizaron unas condiciones de rotura, solubilización o precipitación diferentes para optimizar los resultados de obtención de proteínas. La rotura se realizó bien con un politrón (3 pulsos de 15 seg.) o en un mortero. Tampones de resuspensión: i) TCA 20% directamente (no precipitado); tampones ii) Tris o iii) Urea y una posterior precipitación y solubilización en tampón compatible con proteómica (8M Urea, 4% CHAPS). Las proteínas solubilizadas y clarificadas por centrifugación se cuantifican mediante Bradford y se analizan, a razón de 20 µg teóricos por muestra, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) al 12'5%.

Extracción:

Muestras de **prueba 1 y 2** (2 colículos/tubo)

Prueba 1: Mortero

- **1.1: Rotura:** Polvo fino en N₂, recogido y resuspendido en 200 ul de TCA 20%, DTT 0'7% en acetona. **Precipitación:** -20°C, O/N.
- **1.2: Rotura:** Polvo fino en N₂, recogido y resuspendido en 200 ul de: 10 mM Tris-HCl pH 7.4 (1,21 g/l), 0.15 M NaCl (8,77 g/l), 1 mM EDTA (0,37 g/l). Más de 1 h agitando a 4°C, 1400 rpm. **Precipitación:** Centrifugar 2 min 14.000 rpm y dividir para: i) precipitar con TCA (100 ul) y ii) no precipitar (100 ul).

Prueba 2: Politrón

- **2.3: Rotura:** 3 pulsos, 15 seg, en 200 ul de RB2 (8M Urea, 4% CHAPS). Este se rompió bien en 200 ul, aunque hizo mucha espuma. Agitando 4°C más de 1 h. **Precipitación:** Centrifugar 2 min 14.000 rpm y dividir para: i) precipitar con TCA (el resto) y ii) no precipitar (50 ul).
- **2.4: Rotura:** 3 pulsos, 15 seg, en 200 ul de 10 mM Tris-HCl pH 7.4 (1,21 g/l), 0.15 M NaCl (8,77 g/l), 1 mM EDTA (0,37 g/l). Lo cogía mal para romper, se debió subir el volumen hasta 600 ul. Ahí se rompió bien. Agitando 4°C más de 1 h. **Precipitación:** Centrifugar 2 min 14.000 rpm y dividir para: i) precipitar con TCA (600 ul) y ii) no precipitar (600 ul).

Figura 3. Pruebas de rotura y solubilización empleadas en DIGE para la optimización de la obtención de proteínas.

3- Resto de las técnicas.

Tras los resultados obtenidos, el resto de las muestras procesadas para análisis por los diferentes métodos fueron realizadas de la misma forma (con excepción de pequeñas variaciones específicas de cada metodología), homogenizando con el equipo POLYTRON® y solubilizando en urea 8M,

CHAPS 4% e inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics). Los homogeneizados de muestras individuales se centrifugaron y se almacenaron a unos -80°C hasta su posterior procesamiento.

3.4.2 Valoración proteica

La concentración de proteínas se evaluó por el método Bradford (Bradford, 1976), basado en el cambio de color del colorante Coomassie brilliant blue G-250 en respuesta a diferentes concentraciones de proteínas. Una pequeña alícuota de la muestra de proteínas se diluyó 1000 veces en agua MilliQ. De esa dilución, se toma un volumen de 800 µL y se añaden 200 µL de reactivo Bradford (BioRad). Se agita la mezcla en el vórtex y se deja a temperatura ambiente durante 10 min. A continuación, se mide la absorbancia a la longitud de onda de 595 nm en un lector de microplacas (#LT-4000 Plate Reader, Labtech). La concentración de proteínas se determina extrapolando de una recta patrón, realizada simultáneamente con diluciones de 0, 1, 5, 10 y 20 µg/ml de albúmina sérica bovina.

3.4.3 Electroforesis bidimensional

Las mezclas de proteína fueron precipitadas mediante una disolución metanol/cloroformo/agua (4:1:3 v/v/v) y finalmente el pellet fue resuspendido en un tampón de rehidratación (9M urea, 2M tiourea, 4% CHAPS, 1mM DTT, 1,2% DeStreak, 0,5% tampón con gradiente de pH inmovilizado (IPG)). Para la primera dimensión o isoelectroenfoque, el tamaño de las tiras IPG fue de 13 cm, con un gradiente no lineal de pH 3-10 (Amersham Biosciences, UK). El enfoque isoelectrico se realizó a 50 V durante 12 horas, 500 V durante 1 h, 1000 V durante 1 h, un gradiente de voltaje que oscila desde 1.000 hasta 8.000 V durante 30 min y finalmente 5 horas a 8.000 V hasta acumular 35.000 V. Las tiras se trataron con tampón de equilibrado con SDS (375 mM Tris-HCl pH 8,8, 6 M urea, 20% de glicerol, 2% SDS) más 2% tris- 2-carboxietil-fosfina (TCEP) durante 15 min para la desnaturalización y la reducción de las proteínas. Posteriormente, las tiras se trataron con el mismo tampón de equilibrado suplementado con 2,5% yodo-acetamida para la alquilación de las proteínas. La segunda dimensión de la electroforesis se realizó en geles de SDS- poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10%. Las manchas proteicas se visualizaron mediante tinción de plata siguiendo el protocolo descrito por Heukeshoven (Heukeshoven y Dernick, 1985).

Los spots (manchas) de interés se recortaron manualmente. La digestión se realiza siguiendo el protocolo publicado por Shevchenko (Shevchenko et al., 1996) con pequeñas variaciones como se describe a continuación: los fragmentos recortados del gel se destiñeron con una disolución 1:1 de ferricianuro de potasio 15 mM y 50 mM de tiosulfato de sodio para eliminar

la plata; se lavaron con agua destilada y desionizada (H₂O MilliQ) y se deshidrataron con 100% de acetonitrilo (ACN). A continuación, fueron tratados con ditioneitol (DTT) 10 mM en bicarbonato de amonio 25 mM a 56 °C y posteriormente con 55mM de yodo-acetamida en 50mM de bicarbonato de amonio a temperatura ambiente. Seguidamente, las piezas de gel se lavaron con 100% de ACN y bicarbonato de amonio 20 mM. Se añadió tripsina porcina modificada (sequencing grade, Promega, Madison, Wis, USA), a una concentración final de 6 ng/μL en bicarbonato de amonio 20 mM, y se incubaron a 37 °C durante 16 h. El sobrenadante con los péptidos tripsinizados se secó en un sistema de centrifugación con vacío (#07-748-13, SpeedVac™, Eppendorf) y se resuspendió en 5μL de 0,1% de ácido trifluoroacético y 50% de ACN.

Los geles bidimensionales y los análisis de espectrometría de masas fueron realizados en la Unidad de Proteómica del Centro de Investigación del Cáncer (CIC) de Salamanca.

3.4.4 DIGE

Las muestras finales para analizar se homogeneizaron utilizando el equipo POLYTRON® en buffer de urea (PU) sin precipitar, para evitar pasos que pudiesen suponer una pérdida de proteínas innecesaria. Se cuantificaron mediante Bradford todas las nuevas proteínas obtenidas y se analizaron mediante un gel SDS-PAGE (12'5%) (Fig. 4).

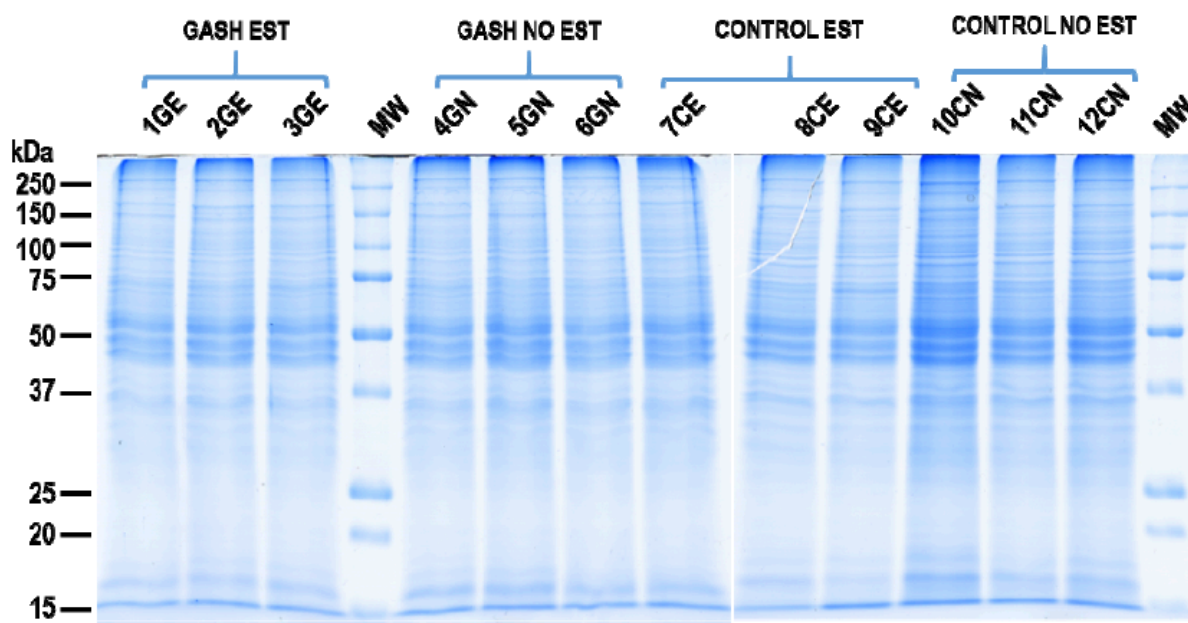


Figura 4. Visualización de las proteínas obtenidas (réplicas biológicas) para DIGE de las diferentes condiciones a analizar mediante geles SDS-PAGE teñidos con Coomassie coloidal.

Este paso sirvió para confirmar la integridad de las muestras y la homogeneidad entre réplicas biológicas en cuanto a perfiles de expresión proteica. Posteriormente, se limpiaron las

proteínas de acuerdo con las instrucciones del Clean-up kit (GE Healthcare) como paso previo de acondicionamiento para el marcaje DIGE.

El marcaje de proteínas mediante colorantes Cy (Amersham CyDye DIGE Fluor, minimal dye labeling kit) fue hecho siguiendo la relación 400 pmol/ μ L de colorante por 50 μ g de proteína durante 30 min en hielo en la oscuridad. La reacción de marcaje fue detenida por la adición de lisina 10 mM durante 10 min. Las muestras fueron combinados según el diseño experimental y hasta 350 μ L de tampón de rehidratación, siguiendo el procedimiento de Vasco Cárdenas et al. (2013).

La primera dimensión se realizó en tiras de 18 cm con rango de pI 3-10NL y la segunda dimensión en geles SDS-PAGE del 12,5%, utilizando los estándares de proteína Precision Plus (Bio-Rad) como marcadores de peso molecular.

Se realizó un escaneado fluorescente, seguido de una tinción con Coomassie para el escaneado visible.

Las proteínas se visualizaron utilizando un EttanTM DIGE Imager (GE Healthcare) con filtros CyDye y 100 μ m como tamaño de píxel. El análisis de la imagen, así como la cuantificación y selección de cambios significativos se llevó a cabo con Software de análisis diferencial DeCyderTM v7.0 (GE Healthcare).

Se utilizó como gel maestro un gel de imagen estándar interno con el mayor número de puntos. Las comparaciones entre diferentes marcajes se realizaron aplicando la prueba t de Student para datos no apareados y ANOVA entre grupos. Para reducir los falsos positivos, se aplicó la tasa FDR (False Discovery Rate).

3.4.5 SDS-PAGE-MS

Las muestras de proteínas se suspendieron en un volumen final de 20 μ L de tampón Laemmli 2x y se aplicaron en pocillos de 1,3 cm de ancho de un gel SDS-PAGE (0,75 mm de espesor, 4% de apilamiento y 7,5% resolviendo). La electroforesis se detuvo cuando el frente alcanzó 1 cm en el gel de resolución. Después de la tinción con Coomassie, se escindieron manualmente las bandas de proteína en cubos (1 x 1 mm) y se colocaron en tubos de microcentrífuga de 0,5 mL. Las piezas de gel se destiñeron en acetonitrilo/bicarbonato de amonio (1:1) a 37°C durante 15 min. Las proteínas se redujeron con DTT 10 mM durante 45 min a 56 °C, se alquilaron con yodoacetamida 50 mM durante 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad y se digirieron con tripsina modificada (Promega, Madison, WI) como se describe por Shevchenko et al. (1996) con modificaciones menores. Brevemente, las piezas de gel se encogieron agregando ACN y se volvieron a hinchar en BA 50 mM que contenía 12 ng/ μ L de tripsina durante 45 min en hielo; Se eliminó el exceso de solución de tripsina y las

piezas de gel se cubrieron con cantidades iguales de BA. La digestión se dejó progresar durante la noche a 37°C. antes de la acidificación con ácido fórmico (TFA) al 1%. Los sobrenadantes se transfirieron a tubos limpios y los péptidos se extrajeron del gel mediante la adición de un volumen de ACN al 50 %: TFA al 0,1 % e incubación durante 15 min en un agitador, el sobrenadante se recogió en el mismo tubo. Los sobrenadantes agrupados se desalinizaron utilizando Stage Tips C18 Empore (Rappsilber et al., 2007), se secaron y almacenaron a -20 °C hasta el análisis por espectrometría de masas.

Espectrometría de masas

Para el análisis LC-MS/MS de fase inversa, se utilizó un sistema nano-UPLC (nanoAcquity, Waters Corp., Milford/MA, EE. UU.) acoplado a un espectrómetro de masas LTQ-Velos-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, San Jose/CA, EE. UU.) a través de una fuente de iones nanoelectrospray (NanoSpray flex , Proxeon, Thermo).

Las condiciones de la cromatografía fueron: columna nanoACQUITY UPLC BEH 1,7 μ m, 130 Å, 75 μ m $\times$ 250 mm C18 (Waters Corp., Milford/MA, EE. UU), caudal de 250 nL/min, gradiente A: ácido fórmico 0,5%, y B: Acetonitrilo de 1 a 40% en 120 min.

El LTQ-Orbitrap Velos se operó en el modo de iones positivos aplicando un cambio automático dependiente de los datos entre la exploración de MS de estudio y la adquisición de espectros de masas en tándem (MS/MS). Los escaneos topográficos se adquirieron en el rango de masa de m/z 400 a 1600, con una resolución de 60 000 en m/z 400 con la opción de bloqueo de masa habilitada para el ion 445.120025 (3).

Los 20 picos más intensos con un estado de carga ≥ 2 y un umbral de intensidad superior a 500 se seleccionaron en la trampa de iones para fragmentación por disociación inducida por colisión con un 35 % de energía normalizada, tiempo de activación de 10 ms, q = 0,25, aislamiento de precursor de ± 2 m/z ancho y activación de banda ancha. El tiempo máximo de inyección fue de 250 ms y 50 ms para las exploraciones y MS/MS, respectivamente. La exclusión dinámica estuvo habilitada durante 90 s.

3.4.6 SHOTGUN

Otro enfoque, especialmente a la hora de estudiar mezclas de proteínas complejas, es llevar a cabo una lisis global, que realizamos mediante la técnica Shotgun, que utiliza una combinación de cromatografía líquida de alto rendimiento combinada con espectrometría de masas. Nos planteamos este abordaje para analizar las diferencias en estado basal del núcleo epileptógeno (CI) del modelo GASH/Sal, en comparación con los controles en las mismas condiciones. Partimos de una mezcla de homogenizado del CI de 4 animales de cada grupo experimental, y tras extraer la muestra, realizamos una digestión trípica, desalado de péptidos

con microcolumnas C18 (Rappsilber et al., 2003) y análisis SHOTGUN por LC-MS/MS con los siguientes parámetros: Gradiente 120 min a 2- 35% en ACN con precolumna Symmetry C18 (5µm 20mm 180µm) y columna BEH C18 1,7 µm 75ID 25 cm, método de adquisición CID Top 20. Búsqueda con MASCOT en bases de datos locales; validación con Percolator FDR 1%. La búsqueda y análisis cuantitativo se hizo con MAXQUANT (Cox et al., 2008), usando el algoritmo de búsqueda Andromeda y base de datos Uniprot *Mesocricetus auratus* (hámster) proteome (versión 2018-10-16) más la base de datos de contaminantes comunes de M. Mann. Se consideraron identificadas aquellas proteínas con al menos 2 péptidos únicos identificados con un 1% de FDR. Se comparó la abundancia de las proteínas mediante la intensidad iBAQ (Schwanhäusser et al., 2013). iBAQ es una de las medidas más usadas para la cuantificación relativa de proteínas. La intensidad de los péptidos precursores que mapean para cada proteína se suma entre sí y se dividen por el número de péptidos teóricamente observables.

3.4.7 iTRAQ-8

Los homogeneizados de muestras individuales se centrifugaron y se colocaron en hielo antes de tratar las muestras en el disruptor ultrasónico (Hielscher UP50H), usando ciclos de 1 min. Los sobrenadantes aclarados se almacenaron a unos -80°C hasta su posterior procesamiento.

Para la determinación de la concentración de proteína total, se utilizó el kit de ensayo de proteínas Pierce 660 nm (Pierce). Para la digestión, se precipitaron 50 µg de proteína de cada condición mediante el método de metanol/cloroformo. Los gránulos de proteínas se resuspendieron y desnaturalizaron en 20 µl de urea 7 M/tiourea 2 M, TEAB 0,1 M, pH 7,5, (SERVA Electrophoresis GmbH). A continuación, se redujeron con 1 µL de Tris (2-carboxietil) fosfina 50 mM (TCEP, AB SCIEX), pH 8,0, a 37 ° C durante 60 min y seguido de 2 µL de reactivo bloqueante de cisteína 200 mM (metanotiosulfonato de metilo (MMTS, Pierce) durante 10 min a temperatura ambiente. Las muestras se diluyeron hasta 120 µL para reducir la concentración de urea / tiourea con TEAB 50 mM.

Digestión, etiquetado de las muestras e identificación de proteínas por huella peptídica mediante espectrometría de masas Triple-TOF

Las digestiones se iniciaron añadiendo 2 µg de tripsina de secuencia modificada (Sigma-Aldrich) a cada muestra en una proporción de 1/25 (p / p), que luego se incubaron a 37 ° C en un agitador durante la noche. Finalmente, las digestiones se evaporaron.

Cada muestra digerida con tripsina, se etiquetó a temperatura ambiente durante 2 horas con media unidad del kit iTRAQ Reagent 8-plex (AB SCIEX, Foster City, CA, EE. UU.). El marcaje iTRAQ se realizó mediante el reactivo iTRAQ 113 = control 1; reactivo iTRAQ 114: GASH1;

reactivo iTRAQ 115: control 2; reactivo iTRAQ 116: GASH 2; iTRAQ 117: control 4; reactivo iTRAQ 118: GASH 4; reactivo iTRAQ 119: control 5; Reactivo iTRAQ 121: GASH 5. Después del etiquetado, las muestras se combinaron y la reacción de etiquetado se detuvo por evaporación. Finalmente, las sales se lavaron usando un cartucho SepPak C18 (Waters).

Para realizar el análisis de cromatografía líquida y espectrometría de masas, se preparó una alícuota de 2 μg de cada muestra para llevar a cabo los análisis 2D-nano LC ESI-MSMS, utilizando un sistema de cromatografía nano-líquida (Eksigent Technologies nanoLC Ultra 1D plus, AB SCIEX, Foster City, CA) acoplado a un espectrómetro de masas Triple TOF 5600 de alta velocidad (SCIEX, Foster City, CA). El volumen de inyección fue de 5 μl . Se utilizó una columna de fase inversa de sílice nanoACQUITY UPLC 75 μm x 15 cm (Waters), con un tamaño de partícula de 1,7 μm . La columna de trampa era un Acclaim PepMap 100 (ThermoFisher Scientific), con un diámetro de partícula de 5 μm y un tamaño de poro de 100 Å, conectado en línea con la columna analítica. La bomba de carga suministró una solución de ácido fórmico al 0,1% en agua a 2 μl / min. La nanobomba proporcionó un caudal de 250 nl / min que hizo funcionar en condiciones de elución en gradiente, utilizando ácido fórmico al 0,1% en agua como fase móvil A y ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo como fase móvil B. A continuación, se realizó la elución en gradiente en un proceso de duración total de 250 min, basado en el siguiente esquema: condiciones isocráticas del 96% A: 4% B durante cinco min, un aumento lineal al 40% B en 205 min, luego un aumento lineal al 90% B durante 15 min adicionales, condiciones isocráticas del 90% B durante diez min y volver a las condiciones iniciales en 2 min.

Para la adquisición de los datos se utilizó un sistema TripleTOF 5600. La ionización se produjo con voltaje de pulverización de iones flotante (ISVF) 2800 V, gas de cortina (CUR) 20, temperatura del calentador de interfaz (IHT) 150, gas de fuente de iones 1 (GS1) 20 y potencial de desagrupamiento (DP) 85 V. Todos los datos fueron adquiridos utilizando el modo de adquisición dependiente de la información (IDA) con el software Analyst TF 1.7 (AB SCIEX, EE. UU.). El escaneo de levantamiento MS de 0.25 s en el rango de masa de 350-1250 Da fue seguido por 30 escaneos MS/MS de 150ms en el rango de masa de 100-1500 (tiempo de ciclo total: 4.5 s). Los criterios de cambio se establecieron en iones mayores que la relación masa/carga (m/z) 350 y menores que m/z 1250 con un estado de carga de 2-5 y un umbral de abundancia de más de 90 recuentos (cps). Los antiguos iones diana se excluyeron durante 20 s. Se utilizó el script de parámetros de energía de colisión rodante (CE) IDA para controlar automáticamente el CE.

3.4.8 RT-qPCR

Extracción de RNA.

Para la extracción de RNA total, se empleó una modificación del método de Chomczynski y Sacchi (Chomczynski y Sacchi, 1987), siguiendo el protocolo recomendado por los fabricantes. Se utilizó 1 mL de TRIzol® por cada 100 mg de tejido, y se procedió a la homogenización de éste mediante el Polytron® (T10 basic Ultra-Turrax, Ika, Alemania). Tras incubarlo durante 5 min a temperatura ambiente, se realizó una extracción selectiva del RNA por separación de fases mediante la adición de 200 µL de cloroformo por cada mililitro de TRIzol® inicial y centrifugación a 12.000 g durante 15 min a 4 °C. El RNA obtenido en la fase acuosa se precipitó con un volumen de isopropanol igual a la mitad del TRIzol® utilizado en el primer paso y se centrifugó a 12.000 g durante 10 min a 4 °C. A continuación, tras retirar el isopropanol, el precipitado obtenido se lavó con un volumen de etanol 70% igual al de TRIzol® utilizado en el primer paso y se centrifugó a 7.000 g durante 5 min a 4 °C. Posteriormente, después de eliminar el sobrenadante y secar el RNA para eliminar cualquier resto de etanol, se resuspendió en agua ultrapura libre de RNAasas, incubando a 60 °C durante 10 min, para favorecer la disolución del precipitado.

Tratamiento de RNA total con DNAasa I, purificación y cuantificación del RNA.

Los RNA obtenidos de las muestras fueron tratados con DNAasa I (Roche, Madrid-España) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Aproximadamente 10-15 µg de RNA en 20,5 µL de RNA total, se trata con 1 µL de DNAasa I 10 U/µL (10 x 10³ unidades) y 2,5 µL de buffer de DNAasa I 10X (400 mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 60 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂; pH 7,9). Esta reacción se incubó a 37 °C durante 15 min. La DNAasa I requiere de cationes divalentes para su máxima actividad (activado por iones de magnesio y estimulado por iones de calcio), posteriormente con la finalidad de disminuir la actividad de la endonucleasa se añadió 1 µL de EDTA 0,2 M (agente quelante que inhibe la actividad enzimática) y para inactivar completamente la actividad de la endonucleasa se incubó la reacción durante 10 min a 75 °C. Asimismo, para eliminar la posible contaminación de DNA genómico, cada muestra fue purificada usando un kit comercial (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones de fabricante. Este kit utiliza membranas de sílice y columnas giratorias, uniéndose los ácidos nucleicos a la fase sólida de la sílice en las condiciones apropiadas.

La concentración de RNA se determinó por espectrofotometría con un equipo NanoDrop (NanoDrop 2000C espectrofotómetro, Thermo Scientific). Este instrumento realiza la cuantificación del RNA usando análisis espectrográfico, basado en que los ácidos nucleicos absorben luz ultravioleta con un patrón concreto. La muestra se somete a luz ultravioleta en la longitud de onda de 260 nm y el instrumento mide la cantidad de luz que atraviesa la muestra: cuanto más luz absorba la muestra, medida a través de la absorbancia de la misma, mayor es la concentración de

ácidos nucleicos (Huss et al., 1983). Se realizaron medidas espectrofotométricas a 230, 260 y 280 nm, realizándose tres cuantificaciones y tomándose el promedio como valor de trabajo para los distintos experimentos. En todas las mediciones, se comprobó que la relación A260/280 se encontrase cercana a 2, correspondiente a muestras puras de RNA.

La “calidad” (no degradación) de las muestras de RNA totales obtenidas se evaluó en el chip “ARN 6000 NanoLabChip” (Agilent, Palo Alto, CA, EE.UU), empleando el bioanalizador Agilent 2100 a través del cual podemos determinar la integridad del RNA mediante la visualización de las bandas de RNAr (RNA ribosómico) 18S y 28S, utilizando un algoritmo que describe tal integridad con la escala RIN (RNA integrity number). Se estableció que las muestras de RNA totales con una escala de RIN superior a 8 eran las óptimas para realizar los experimentos.

Las proteínas diferencialmente expresadas más significativas se evaluaron por RT-qPCR. Esta técnica presenta dos etapas diferenciadas, una primera denominada retrotranscripción (RT) o transcripción reversa, consistente en la síntesis de DNAc a partir de RNAm, y una segunda etapa que utiliza como molde de DNA el propio DNAc sintetizado anteriormente, que es la propia qPCR.

En primer lugar, para obtener DNAc por retrotranscripción de RNAm, se utiliza el kit ImProm-II™ Reverse Transcripción System (Promega) siguiendo las especificaciones del fabricante. Inicialmente, se desnaturaliza por calor una mezcla de 1 µg de RNA total y 0,5 µg del oligonucleótido (dT)15 a 70 °C durante 5 min, tras lo cual se enfrió en hielo. Esta reacción se añade a una mezcla preparada previamente que contiene 1 µL de transcriptasa inversa ImProm-II™, 4 µL de tampón 5 X ImProm-II™, MgCl₂ 1,5-8,0 mM, una mezcla de dNTP (desoxinucleótidos trifosfato) 0,5 mM, 20 U del inhibidor de ribonucleasas Recombinant RNAsin® y agua ultrapura libre de RNAsas hasta un volumen final de 15 µL. La reacción se somete durante 5 min a 25 °C, lo que permite que el cebador anille con el RNA molde; posteriormente, se incuba a 42 °C durante 1 hora, para que la transcriptasa sintetice el DNAc. Finalmente, la transcriptasa inversa se inactiva incubando 15 min a 70 °C las mezclas de reacción. En la segunda etapa, con el objetivo de evaluar los cambios en los niveles de expresión de los genes diferencialmente expresados, se realizó una qPCR o también denominada PCR a tiempo real, que permite cuantificar el nivel de DNA (producto de PCR) obtenido en cualquier momento de la propia PCR (amplificación) mediante una señal de fluorescencia. Los valores logarítmicos de fluorescencia, representados frente al número de ciclos, permiten valorar la cantidad de DNAc inicial. Estos valores, son inversamente proporcionales a la cantidad de DNAc inicial y se expresan como Ct (del inglés, cycle threshold) o ciclo umbral (Schmittgen y Livak, 2008). Previamente a la realización de la qPCR como tal, se realizó un análisis de la eficiencia de los cebadores específicos para cada uno de los genes a estudiar, de ese modo, se pudo establecer el rango dinámico de expresión de cada pareja de cebadores y también la denominada Eficiencia (E). Del mismo modo, mediante este análisis se estableció la concentración

óptima a la cual se pudo realizar la cuantificación relativa para cada uno de los genes a estudio. Para ello y de forma específica, se realizó una dilución seriada del DNAC de cualquiera de las muestras a estudio y se calcularon los Ct obtenidos para cada una de las concentraciones dispuestas. Seguidamente, la qPCR como tal fue realizada usando la sonda inespecífica SYBR-Green I, fluorocromo que se une a la doble hebra de DNA. Para poder distinguir los productos de PCR generados en la qPCR con este tipo de sonda se realiza un análisis de curva de desnaturalización, que nos permite discriminar los productos de PCR específicos de los inespecíficos para sólo contabilizar los datos de fluorescencia de productos de PCR específicos.

El volumen final para cada reacción de qPCR fue de 20 µL: 10 µL de Master Mix (PCR Master Mix Power SYBR-Green, Applied Biosystems), 0,8 µL de cada cebador (Tabla 1), 7,4 µL de agua ultrapura y 1 µL de DNAC en una concentración de 1 ng/µL. La reacción de amplificación de PCR tuvo lugar en un termociclador acoplado a un fluorímetro (ABI Prism 7000, Applied Biosystems) con las siguientes condiciones: 10 min a 95 °C seguido de 40 ciclos de 15 s a 95 °C y 1 minuto a 60 °C. Seguidamente, se ejecutó el programa específico para analizar la curva de disociación mencionada. Todas las qPCRs fueron realizadas por triplicado para cada muestra (3 réplicas), utilizando un mínimo de tres muestras y un máximo de 6; asimismo, en todas las qPCRs se incluyeron controles negativos.

El tipo de análisis de datos empleado para la cuantificación de las qPCRs fue el de cuantificación relativa, a una condición dada (“control”), utilizando el método de las Ct, útil en el caso de que las Eficiencias (E) y/o pendientes (b) de las rectas patrón de los rangos dinámicos ($Y = a * X + b$) sean iguales entre las PCRs de muestras a comparar. De este modo, la E de la qPCR para cada par de cebadores, junto con los valores del Ct obtenidos, fueron usados para calcular la expresión relativa de cada transcrito (FC), de acuerdo con la ecuación $E^{-(\Delta Ct \text{ “condición 1”} - \Delta Ct \text{ “condición 2”})}$, donde la E se refiere a la eficiencia de la PCR, ΔCt de cada “condición” (“condición 1”, es en nuestro caso, el transcriptoma de la línea de hámsteres sirios GASH:Sal y, “condición 2”, es la de los hámsteres sirios control) es igual a la Ct del “gen de interés” – Ct del “control interno, gen endógeno o housekeeping” (Schmittgen y Livak, 2008; Livak y Schmittgen, 2001). Para determinar el gen endógeno óptimo a utilizar en la cuantificación de las qPCRs se analizaron los perfiles de expresión de dos genes, β -actina (β -act) y gliceraldehido 3-fosfatasa deshidrogenasa (*Gadph*). Los niveles de expresión de cada uno de ellos fueron medidos en las dos líneas de hámsteres sirios por RT-qPCR y utilizando el programa NormFinder (Andersen et al., 2004) calculamos las variaciones de expresión génica intra e intergrupar, concluyendo que el gen de la β -actina es el más estable. Como gen de referencia o control endógeno, se empleó el gen de la β -actina.

3.5 Análisis de los resultados

3.5.1 Identificación de proteínas

La identificación de proteínas se realizó mediante la búsqueda de espectros de MS/MS en la base de datos de proteínas de *Mesocricetus auratus* Uniprot (publicación en octubre de 2018) con el algoritmo Andromeda (Cox et al., 2011) y MAXQUANT (Cox et al., 2008). Los parámetros de búsqueda fueron los siguientes: digestión totalmente triptica con hasta dos escisiones perdidas, tolerancias de masa de 20 ppm y 0,6 Da para iones precursores y productos, respectivamente, oxidación de metionina y acetilación de la proteína n-terminal se establecieron como modificaciones variables y carbamidometilación de cisteína como modificación fija. Se usó una tasa de FDR del 1%, utilizando la búsqueda en la base de datos Target-Decoy para la validación de péptidos. Solo se consideraron los grupos de proteínas con al menos dos péptidos identificados. La abundancia relativa de proteínas se comparó utilizando la puntuación iBAQ (Schwanhäusser et al., 2011).

En el caso de iTRAQ, los espectros MS/MS se exportaron a formato mgf usando Peak View v1.2.0.3 y se buscaron usando Mascot Server 2.5.1, OMSSA 2.1.9, X! TANDEM 2013.02.01.1 y Myrimatch 2.2.140 contra una base de datos compuesta de objetivo / señuelo construido a partir de las secuencias del proteoma de referencia de *Mesocricetus auratus* en la base de conocimiento de “Uniprot” (enero de 2020), junto con los contaminantes que ocurren comúnmente. Todos los análisis finales se realizaron con el software Proteobotics (Madrid, España) (Ramos-Fernández et al., 2008; Lopez-Serra et al., 2014).

La información obtenida se agrupó en hojas de cálculo de Microsoft Office Excell, ordenada por significación estadística utilizando el criterio FDR, aceptando aquellos datos con un valor $p < 0 = 0,01$, es decir que no se supere el 1% de diferencia entre muestras.

En el caso de la identificación de péptidos, se incluyó la información sobre el espectro MS/MS, como, por ejemplo, el archivo de procedencia, el tiempo de retención en min, la carga y la relación masa/carga del ion precursor. Además, se incluyó también la información relativa del péptido asignado y de su proteína precursora, donde se adjuntan los códigos PSIMOD utilizados en el experimento.

Para la identificación de proteínas, se seleccionó el conjunto de proteínas más pequeño posible de cada grupo, porque permite explicar la totalidad de los péptidos identificados. A continuación, se etiquetaron los péptidos identificados según su grado de redundancia, diferenciándose distintos tipos de péptidos:

“Unique peptide”: péptido que sólo puede ser generado por una única secuencia en la base de datos, por lo que permite identificar de forma completamente inequívoca la presencia de dicha proteína en la muestra.

“Inferred peptide”: péptido que puede ser generado por más de una secuencia en la base de datos, pero que puede atribuirse con cierta seguridad a una proteína en concreto.

“Ambiguous”: péptido cuya presencia puede ser explicada por más de una proteína inferida, sin que pueda atribuirse específicamente a una de ellas con seguridad.

“Excluded”: péptido que, al no alcanzar el nivel de confianza estadística requerido, no ha participado en el proceso de inferencia de proteínas ni es considerado en el cálculo de la cobertura de secuencia (% sequence_coverage).

Se incluyeron también la cabecera FASTA y algunas propiedades fisicoquímicas como el peso molecular en kDa, el punto isoelectrico, o el índice GRAVY de hidrofobicidad. Por motivos de claridad, se incluyeron los espectros asignados a las proteínas falsas, que se utilizan con fines de control de calidad en el proceso de identificación de péptidos y proteínas.

Análisis cuantitativo

En siguiente lugar se realizó el análisis cuantitativo en el cual se utilizaron solamente las señales de espectrometría de masas asociadas a los péptidos identificados con el criterio FDR visto con anterioridad. Para cada proteína inferida, los péptidos que cumplían el criterio se clasificaron por su nivel de redundancia para formar los distintos grupos cuantitativos, donde cada uno de ellos se definen por las columnas “contrast”, “inferredIDs”, “peptide”, y “modif”.

El tipo de grupo inferido utiliza péptidos únicos y de este tipo, constituyendo la hipótesis cuantitativa de referencia para una determinada proteína.

Los péptidos ambiguos se segregan en hipótesis cuantitativas independientes.

Los péptidos que contienen residuos con modificaciones químicas también forman grupos cuantitativos separados, es decir, se cuantifican por separado el péptido normal y el modificado.

El uso de grupos de cuantificación evitó distorsiones en las mediciones cuantitativas ocasionadas por las limitaciones intrínsecas al proceso de inferencia de proteínas y permitió la cuantificación específica de péptidos modificados postraduccionalmente. Es de importancia indicar que todas las señales han sido sometidas a procesos de eliminación de ruido, control de calidad y normalización antes del análisis estadístico.

Para cada contraste se incluyó una tabla de resultados de análisis de regulación diferencial, acompañadas de varias medidas de significación estadística, utilizando como criterio de significación un p -valor $< 0,05$. Además, se adjuntaron dos tablas resumen que incluyen los valores de log 2 fold change de todos los contrastes disponibles para cada grupo de cuantificación y para cada péptido.

Los ratios de abundancia se expresan en logaritmo en base 2. Es por ello, que cabe tener en cuenta:

definición del log ratio: $\log_fold_change = \log_2(x/y) = \ln(x/y)/\ln(2)$

conversión a ratio (escala decimal): $ratio\ x/y = 2^{\log_fold_change}$

recodificación del contraste: $\log_2(y/x) = -\log_2(x/y)$

3.5.2 Análisis Bioinformático

Uno de los medios de análisis más interesantes son las tablas descritas en resultados en las que se pueden observar individualmente los niveles de expresión proteica sobreexpresados o infraexpresados a través del dato del valor del nivel de expresión de un transcrito en una condición frente a otra (FC, del inglés, fold change).

Para los análisis estadísticos de interacción génica y proteica, se realizó en primer lugar un gráfico denominado Volcano plot, desarrollado a partir del programa GraphPad Prism 8, donde se separan todas las proteínas analizadas. Se tienen en cuenta los valores de las variables “*p*-value” (< 0,05, eje X) y “log 2 fold change” (> 0,321 y < -0,321, eje Y), observando los que se sobreexpresan y los que se encuentran infraexpresados.

Posteriormente, se utilizaron diferentes bases de datos biológicas, de función molecular, componente celular, fenotipo asociado a enfermedad y rutas metabólicas, para la anotación funcional de los genes que codifican las proteínas diferencialmente expresados. Concretamente, las bases de datos utilizadas fueron:

- ENRICHR, 2020. [<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>]. Esta plataforma contiene una gran cantidad de bases de datos, donde al insertar los genes codificantes de las proteínas de interés, se pueden obtener gráficos de análisis de transcriptomas, vías metabólicas o enfermedades en las que intervienen las proteínas codificadas por estos. Permite, además, realizar análisis ontológicos GO con el objetivo de observar en que vías metabólicas intervienen los genes sobreexpresados e infraexpresados, prestando especial interés en las bases de datos GO Biological Process, GO Molecular Function y GO Cellular Component.

- The PANTHER Classification System, [<http://www.pantherdb.org/>] es una base de datos gestionada por el Gene Ontology Reference Genome Project, la cual permite la clasificación de grupos de proteínas relacionadas evolutivamente y su clasificación a través de sus funciones

- STRING 10.0. [<http://string-db.org/>]: Base de datos que establece redes de interacciones entre proteínas, tanto las ya conocidas como las putativas. Estas interacciones incluyen tanto las directas (físicas) como las indirectas (funcionales), y están basadas en diferentes bases de datos, incluyendo contextuales, experimentales, bibliográficas o de coexpresión. Varias organizaciones como el Swiss Institute of Bioinformatics, el NNF Center for Protein Research, el EMBL Heidelberg, la Universidad de Dresden o la Universidad de Zúrich gestionan esta base de datos

- CTD [Comparative Toxicogenomics Database; <http://ctdbase.org/>]. Base de datos comparativa toxicogenómica gestionada por MDI Biological Laboratory y NC State University.

- KEGG PATHWAY [<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>] es una base de datos de vías metabólicas y de interacciones moleculares de la enciclopedia de genes y genomas gestionada por Kanehisa Laboratories de Kioto (Japón) y es utilizada para el análisis de las rutas metabólicas en las que están implicados un determinado grupo de genes o proteínas.

3.5.3 Localización subcelular de las proteínas

Para ubicar las proteínas diferencialmente expresadas en el estudio, se recurrió a la base de datos Genecards (<https://www.genecards.org>).

3.5.4 Análisis comparativos

El análisis proteómico comparativo entre los animales GASH/Sal y los controles, ambos de la especie *Mesocricetus auratus*, se ha realizado con los genes relacionados con las proteínas expresadas diferencialmente. Asimismo, se ha trabajado con los genes correspondientes a la especie *Homo sapiens*, utilizando un paquete en R (gprofiler2) para encontrar los genes ortólogos en humano.

Se han estudiado los resultados de 3 métodos de detección y cuantificación de proteínas; iTRAQ (etiquetas isobáricas para cuantificación relativa y absoluta), SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico + espectrometría de masas) y SHOTGUN.

A partir de los genes/proteínas expresados diferencialmente se buscarán los términos enriquecidos empleando el paquete gprofiler2. Dicho paquete aplica el test hipergeométrico para calcular el *p*-valor asociado a los términos encontrados. Asimismo, se ha empleado un método de corrección estadístico poco conservativo, FDR.

Para los tres métodos de detección de proteínas se destacarán los términos con una mayor significación estadística.

Las bases de datos que se consultan por defecto gracias a gprofiler2 son las siguientes:

1. GO (Gene Ontology): ontología génica, 2. KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), 3. REACTOME y WP (WikiPathways): rutas biológicas, 4. CORUM: complejos proteicos, 5. TF (TRANSFAC): motivos reguladores, 6. miRTarBase: dianas de miRNA, 7. HPA (Human Protein Atlas): especificidad de tejido de genes/proteínas y 8. HP (Human Phenotype Ontology): fenotipos humanos.

Finalmente, para la realización de los mapas de interacción (tree maps), se utilizó el paquete en R rrvgo.

4- RESULTADOS

4.1- Diferencias proteicas del CI entre el hámster control y el GASH/Sal en condiciones basales

Antes de comenzar los experimentos, procedimos a la optimización del método para la extracción de proteínas. Los colículos de dos cerebros de hámster se usaron como prueba para optimizar las condiciones iniciales de rotura. Cada uno de ellos se utilizó con unas condiciones de rotura, solubilización o precipitación diferentes (Tabla 2).

Prueba	Tubo	Microtubo vacío (g)	Microtubo + muestra (g)	Muestra (g)	Muestra (mg)	Rotura
1	1	1,0018	1,0071	0,0053	5,3	Mortero+ TCA
1	2	0,9870	0,9939	0,0069	6,9	Mortero+ buffer TRIS
2	3	0,9917	0,9978	0,0061	6,1	Politrón+RB2
2	4	1,0050	1,0109	0,0059	5,9	Politrón+Buffer

Tabla 2. Resumen de las masas de partida para la extracción de proteínas y métodos de rotura y solubilización de proteínas utilizados. Las muestras Prueba 1 y 2 con dos colículos por tubo se repartieron para dos condiciones.

Se puede observar que la rotura mediante el “Polytrón®” y la posterior solubilización en buffer con urea o en buffer con Tris y precipitación con TCA (flechas rojas), dan los mejores resultados (Fig. 5), aunque los restantes métodos tampoco presentan degradación de las proteínas, pero éstas aparecen más diluidas.

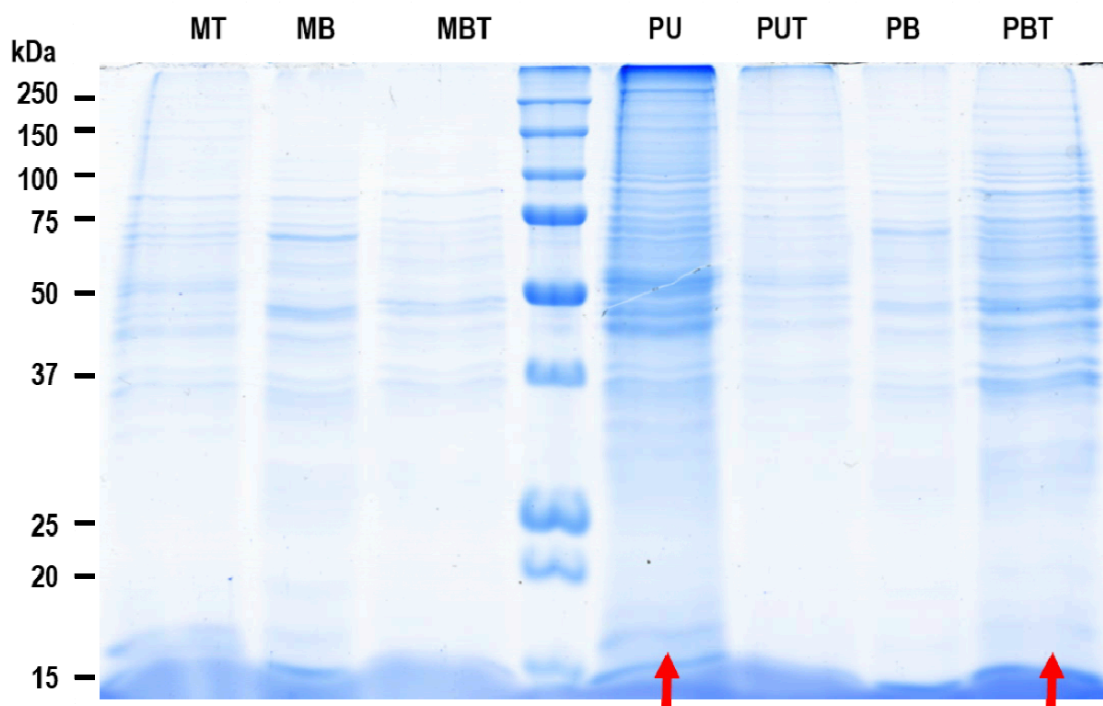


Figura 5. Análisis de las proteínas obtenidas mediante diferentes métodos de rotura, precipitación y solubilización. Abreviaturas: M-Mortero; P-polytrón; U- buffer Urea (8M, 4% CHAPS); B-buffer Tris (10mM Tris-HCl pH 7,4; 0,15M NaCl, 1mM EDTA); T-PRECIPITADO CON tca (20% +0,07% DDT en acetona). Las siglas que no terminan con una “t” son muestras sin precipitar.

4.1.1 Electroforesis bidimensional

Se analizaron por electroforesis bidimensional una mezcla de muestras del CI pertenecientes a animales control y GASH/Sal en condiciones basales, obteniéndose patrones de manchas tal y como se aprecia en la figura 6.

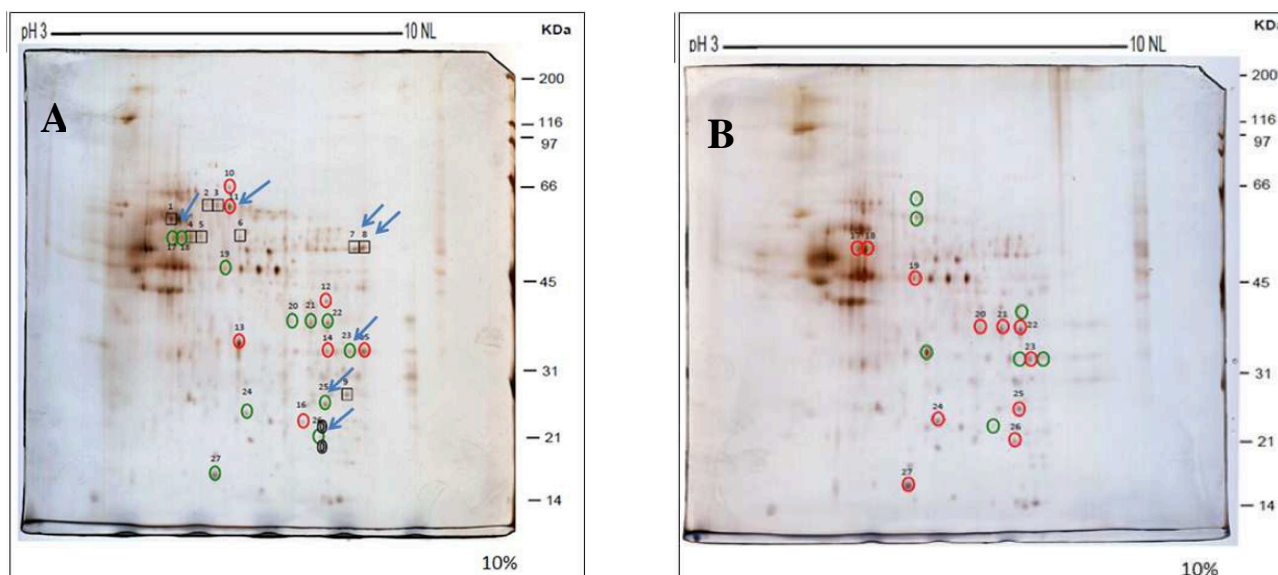


Figura 6. Electroforesis 2D correspondientes a animales controles (A) y de la línea GASH/Sal (B). Significado de los símbolos representados en la figura: Círculo rojo (●), indica las manchas proteicas en mayor cantidad con respecto al otro grupo experimental; Círculo verde (○), indica las manchas proteicas en menor cantidad con respecto al otro grupo experimental; Cuadrado, indica las manchas proteicas exclusivas de ese grupo experimental; Flechas azules, indica las manchas proteicas seleccionadas para su posterior análisis. (La comparativa de la cantidad proteica se realiza de forma cualitativa).

De forma cualitativa, se muestran en verde las manchas proteicas que parecen disminuir drásticamente en una muestra con respecto a la otra, y en rojo las que están presentes en más cantidad al comparar las dos condiciones. Con un cuadrado, se identifican las manchas proteicas que aparecen de manera exclusiva en una de las muestras. En general, se observa menos cantidad de proteína en los animales GASH/Sal respecto a los controles. En total, fueron identificados 27 manchas proteicas, 11 de los cuales estaban en mayor concentración y 7 en menor concentración en el GASH/Sal con respecto al control (Figura 6B). En el control, se encontraron 9 manchas proteicas exclusivas de este grupo experimental (Figura 6A).

Se seleccionaron las manchas proteicas que se consideraron más apropiadas para su análisis posterior a la vista de los resultados cualitativos. Las manchas proteicas seleccionadas fueron 7, 8, 11, 18, 23, 25, 26 y 27 (indicados mediante una flecha azul en la Figura 6), se procesaron según la metodología descrita y se analizaron con espectrometría de masas MALDI-TOF. Con esta técnica, empleando un valor de puntuación MOWSE superior a 45 fueron considerados como significativos ($p < 0,05$). Ninguno de los resultados de las muestras superó ese nivel de significación, por lo que la

búsqueda en la base de datos condujo a resultados no redundantes, como muestran las gráficas de la Figura 7.

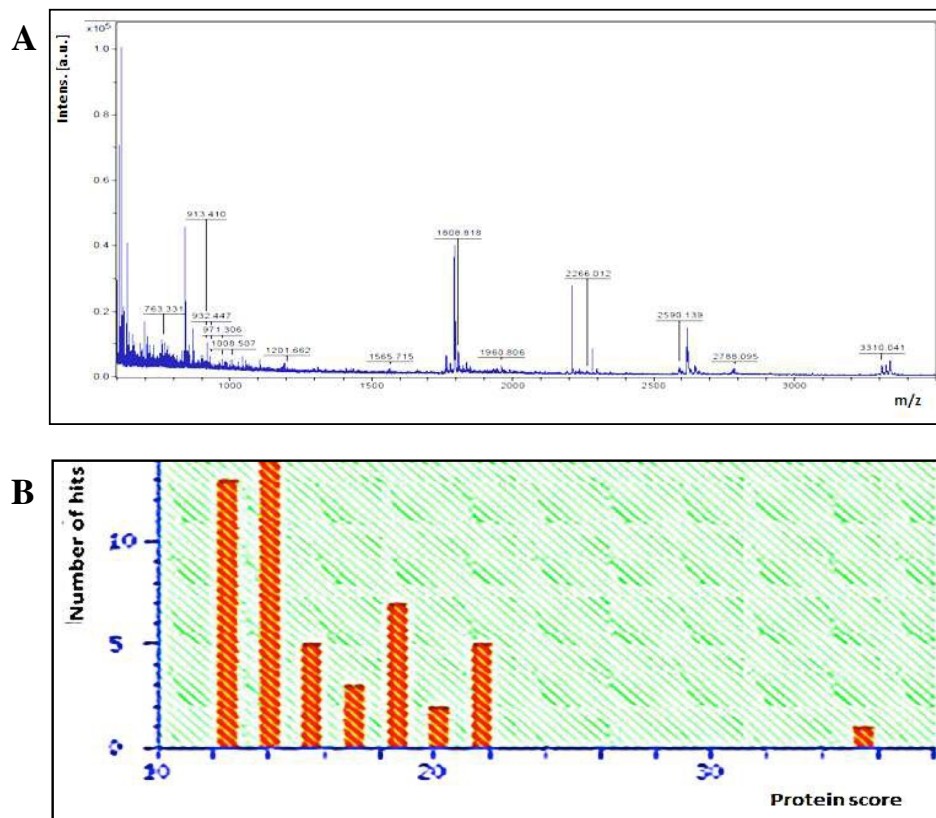


Figura 7. A. Espectro MALDI-TOF de la mancha proteica número 27. Se sometió a la digestión en gel de las proteínas con tripsina y se realizó después un análisis mediante MALDI-TOF. **B.** Histograma de probabilidades de identificación proteica. El histograma representa la cantidad de proteína según el algoritmo Mascot. En ordenadas se representa el $-10 \cdot \log(P)$, donde P es la probabilidad de que se observe una coincidencia de la muestra con las proteínas de la base de datos. Los valores proteicos mayores de 45 son significativos ($p < 0.05$). En ordenadas, el número de coincidencias (del inglés, number of hits).

Al no funcionar el método de anterior, se realizó cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas (LC-MS/MS) de un bloque de 7 muestras seleccionadas de los geles bidimensionales, obteniéndose resultados en 6 de ellas. Las manchas proteicas seleccionadas para realizar el ensayo fueron 7, 8, 11, 18, 23, 25 y 26. El número 11 no mostró resultados. Sólo se consideraron las proteínas identificadas con dos péptidos o más.

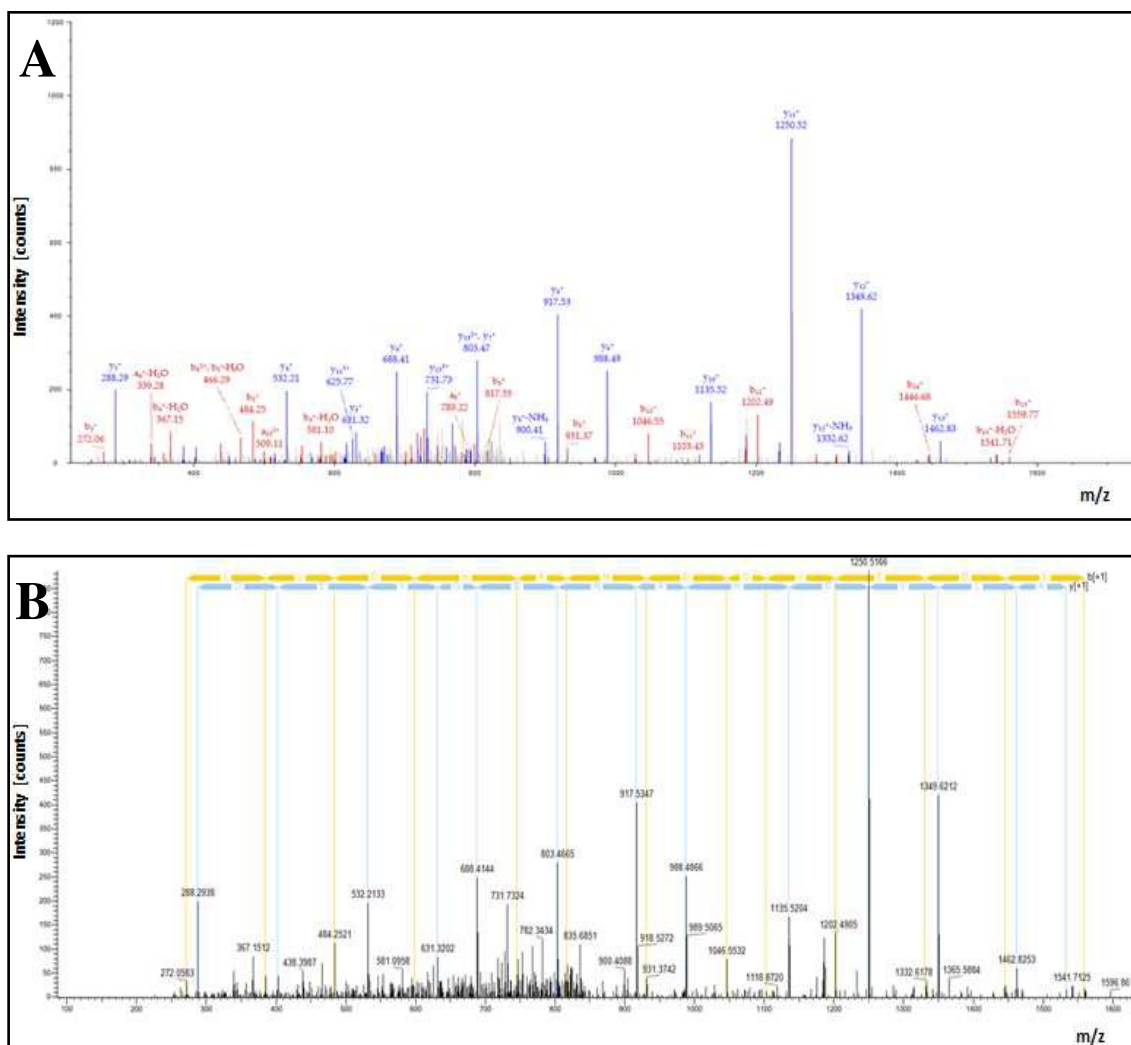


Figura 8. A- Espectro de fragmentación de la mancha proteica número 26. **B-** Espectro de fragmentación de la mancha proteica número 26 tras hacer la lectura de la serie de iones b e y.

Las proteínas identificadas fueron: **ATP- sintasa** (subunidad alfa), **proteína ácida fibrilar glial**, **ATPasa tipo V** (subunidad B), **alfa-internexina**, **gliceraldehído-3-P deshidrogenasa**, **malato deshidrogenasa**, **glutación S-transferasa pi** y **Ran** proteína nuclear de unión GTP. El número de la mancha proteica y de proteínas identificadas no concuerda directamente, ya que existen algunos puntos sin proteína identificada de manera significativa, y otras proteínas están presentes en más de una mancha proteica. La tabla 3 muestra los resultados obtenidos mediante LC-MS/MS. Para el análisis de los mismos, se obviaron las keratinas, ya que son un contaminante típico en este tipo de técnicas. Además, hubo proteínas que fueron identificados a partir de múltiples puntos. Como vemos en la tabla 3, puede ocurrir, en algunos casos excepcionales, que la misma proteína se encuentre en dos manchas proteicas distintas; este tipo de fenómeno es común en los análisis proteómicos basados en geles, y puede ser explicado por las interacciones físicas entre algunas proteínas o debido a modificaciones post-transduccionales, como por ejemplo fosforilación

	SPOT	Nombre proteína	Gen	Control	GASH:Sal	Localización celular	Función
1	7,8,18	ATP- sintasa (subunidad alfa)	Atp5a1	▲	■	Mitocondria	Cataliza la síntesis de ATP
2	18	Proteína ácida fibrilar glial	Gfap	↓	↑	Citoplasma	Proteína del citoesqueleto , marcador específico de célula
3	18	ATPasa tipo V (subunidad B)	Atp6v1b2	↓	↑	Membrana plasmática	Bomba de protones vacuolares, gran importancia digestión celular
4	18	Alfa-internexina	Ina	↓	↑	Citoplasma	Organización del citoesqueleto, morfogénesis neuronal
5	23	Gliceraldehído-3-P deshidrogenasa	Gapdh	↓	↑	Citoplasma	Metabolismo carbohidratos , ARNt vinculante , regulación de transcripción ,apoptosis ,organización del citoesqueleto
6	23	Malato deshidrogenasa	Mdh1	↓	↑	Citoplasma	Metabolismo de carbohidratos, glucólisis
7	26	Glutación S-transferasa pi	Gstp1	↓	↑	Citoplasma, mitocondria, núcleo.	Conjugación de glutatión reducido a una amplia serie de electrófilos hidrófobos exógenos y endógenos. Puede metabolizar 1-cloro- 2,4 - dinitrobencono . Regula la actividad de CDK5 a través de p25/ p35 para prevenir la neurodegeneración
8	26	Ran proteína nuclear unión GTP	Ran	↓	↑	Núcleo, citoplasma, melanosoma. Fundamentalmente en el núcleo durante la interfase.	Regulación movimiento macromoléculas a través del poro nuclear, control de síntesis de ADN, regulación formación y organización de microtúbulos, condensación cromatina

Tabla 3. Resumen de los datos comparativos de expresión génica del colículo inferior de hámsteres control y GASH:Sal en condiciones basales. Los símbolos representan lo descrito a continuación: ↑ mayor cantidad de la proteína, ↓ menor cantidad de proteína, ■ no presencia de la proteína de forma significativa, ▲ presencia de la proteína de forma significativa.

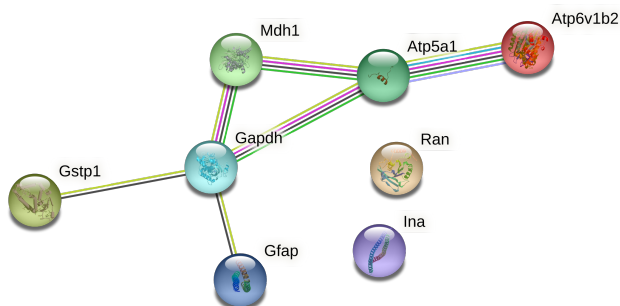


Figura 9. Interacción entre los genes codificantes de las proteínas encontradas experimentalmente, donde las líneas representan interacciones entre ellas. Esquema obtenido de la página web <http://string-db.org/>

4.1.2 SDS-PAGE-MS

4.1.2.1 Descripción de proteínas diferencialmente expresadas.

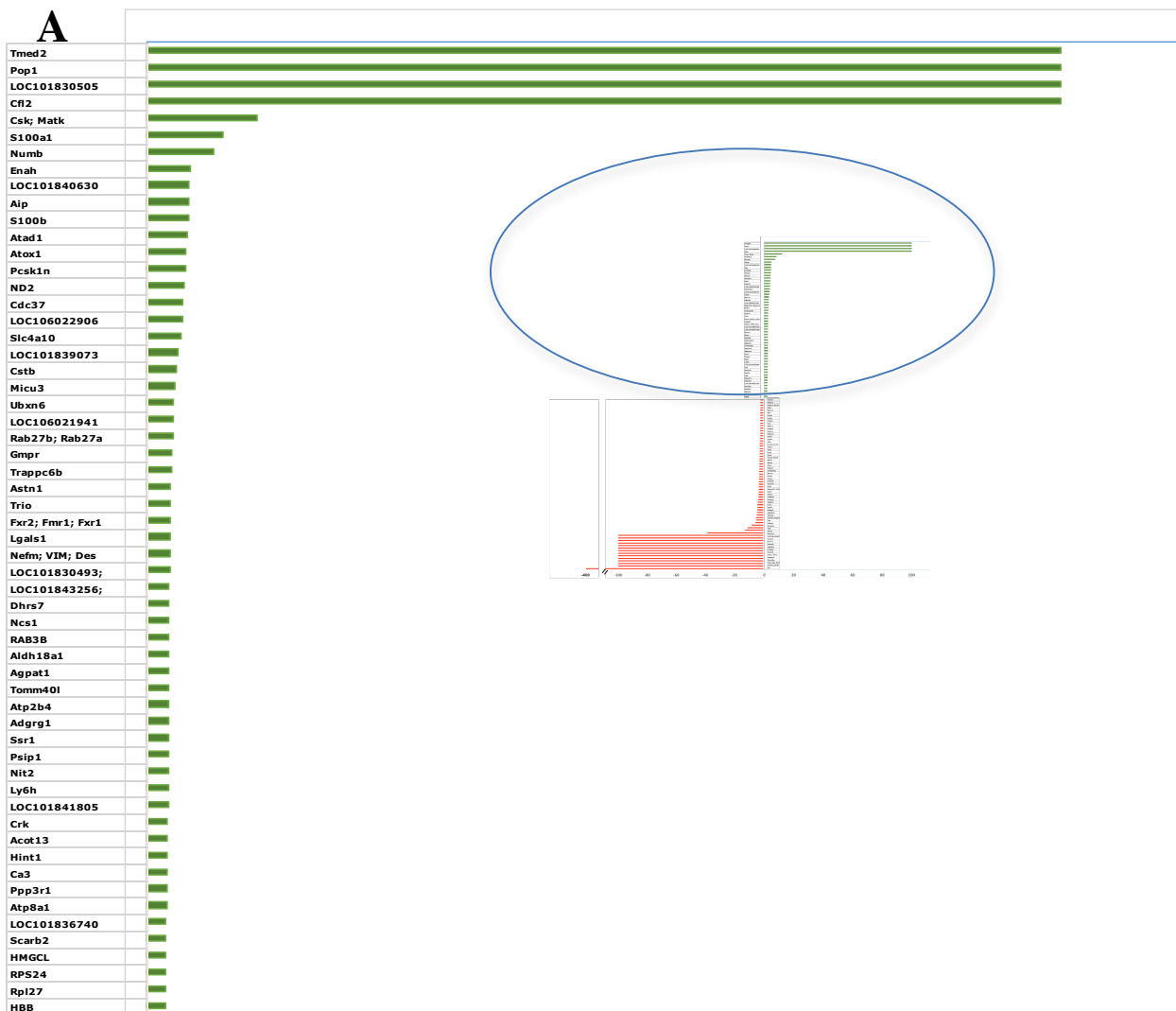
De la mezcla de tejido del CI, tanto de controles como de GASH/Sal, se identificaron 126 proteínas diferencialmente expresadas, con IBAQs >2 y más de dos péptidos para la identificación. De ellas, 59 estaban infraexpresadas frente a los controles y 67 sobreexpresadas. Hay también proteínas que únicamente aparecen en un tipo de muestra, bien en los controles (14) o en el GASH/Sal (5).

La relación de proteínas se refleja en la tabla 4.

Gen	Proteína	Ratio IBAQ	Gen	Proteína	Ratio IBAQ
Cfl2	cofilin-2	-100,0	Txndc5	thioredoxin domain-containing protein 5	2,0
LOC101830505	ADP-ribosylation factor 2	-100,0	GRK2; Adrbk1	G protein-coupled receptor kinaseBeta-adrenergic receptor kinase 1; G protein-coupled receptor kinase	2,0
Pop1	ribonucleases P/MRP protein subunit POP1	-100,0	Ttc7b	tetratricopeptide repeat protein 7B isoform X2, 1	2,0
Tmed2	transmembrane emp24 domain-containing protein 2	-100,0	Rab12	ras-related protein Rab-12	2,1
Csk; Matk	Tyrosine-protein kinase	-100,0	Erlin2; Erlin1	erlin-2; erlin-1	2,1
S100a1	Protein S100	-8,4	ND1	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1	2,1
Numb	protein numb homolog isoform X4, 3, 2, 1	-7,4	Eps15	epidermal growth factor receptor substrate 15 isoform X2, 1	2,1
Enah	protein enabled homolog isoform X6, 7, 5, 4, 3, 2	-4,7	Nln	neurolysin, mitochondrial	2,1
LOC101840630	neurofilament light polypeptide-like	-4,7	Syn3	synapsin-3 isoform X1, 2	2,2
Aip	AH receptor-interacting protein	-4,6	Sv2b	synaptic vesicle glycoprotein 2B	2,2
S100b	Protein S100	-4,6	Ttyh3	Protein tweety homolog	2,2
Atad1	ATPase family AAA domain-containing protein 1	-4,4	Jup	junction plakoglobin isoform X1	2,2
Atox1	copper transport protein ATOX1 isoform X2	-4,2	Rpl23	60S ribosomal protein L23	2,2
Pesk1n	proSAAS	-4,2	Ckap4	cytoskeleton-associated protein 4	2,3
ND2	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 2	-4,0	Sar1a	GTP-binding protein SAR1a	2,3
Cdc37	hsp90 co-chaperone Cdc37	-3,9	Wdr47	WD repeat-containing protein 47 isoform X4, 3, 1	2,4
LOC106022906	cytosolic purine 5'-nucleotidase-like	-3,8	Pck2	phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP], mitochondrial	2,4
Slc4a10	Anion exchange protein	-3,8	Galk1	galactokinase	2,5
LOC101839073	isochorismatase domain-containing protein 2A, mitochondrial-like	-3,4	Tfrc	transferrin receptor protein 1	2,5
Cstb	cystatin-B	-3,2	Srsf5; Srsf4	serine/arginine-rich splicing factor 5 isoform X2, 1; serine/arginine-rich splicing factor 4	2,5
Micu3	calcium uptake protein 3, mitochondrial	-3,0	Cbr4	carbonyl reductase family member 4	2,6
Ubxn6	UBX domain-containing protein 6	-2,9	Pfas	phosphoribosylformylglycinamide synthase	2,6
LOC106021941	serine/threonine-protein kinase DCLK2-like	-2,9	Cars	cysteine--tRNA ligase, cytoplasmic	2,6
Rab27b; Rab27a	ras-related protein Rab-27B; ras-related protein Rab-27A	-2,8	Stx4	syntaxin-4 isoform X2, 1	2,6
Gmpr	GMP reductase	-2,7	Kif1a; Kif1b	kinesin-like protein KIF1A isoform X10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1;	2,6
Trappc6b	trafficking protein particle complex subunit 6B	-2,6	Rtn3	Reticulon	2,7
Astn1	astrotactin-1 isoform X2, 1	-2,6	Blyra	Biliverdin reductase A	2,7
Trio	triple functional domain protein	-2,6	Dcxr	L-xylulose reductase isoform X1; L-xylulose reductase	2,7
Fxr2; Fmr1	fragile X mental retardation syndrome-related protein 2;	-2,5	Phpt1	14 kDa phosphohistidine phosphatase	2,8
Lgals1	Galectin	-2,5	LOC101837461	contactin-associated protein-like 2	2,9
Nefm; VIM; Des	neurofilament medium polypeptide;Vimentin; Desmin	-2,5		microtubule-actin cross-linking factor 1 isoforms X15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1	2,9
LOC101830493	uncharacterized protein LOC101830493;	-2,5	Macf1	sorting nexin-2	2,9
LOC101843256	Histone H2B;	-2,5	Snx2	target of Myb protein 1 isoform X1, X2	3,1
Dhrs7	dehydrogenase/reductase SDR family member 7	-2,5	Tom1	Transporter	3,1
Ncs1	neuronal calcium sensor 1	-2,4	Slc6a5	phosphatidylinositolide phosphatase SAC1	3,1
RAB3B	Ras-related protein Rab-3B	-2,4	Cltb	Clathrin light chain	3,1
Aldh18a1	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase	-2,4	Mrps27	28S ribosomal protein S27, mitochondrial;	3,2
Agpat1	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase	-2,4	Syt7	synaptotagmin-7 isoform X5, X4, X3, X2, X1	3,3
Tomm40l	mitochondrial import receptor subunit TOM40B	-2,4		pyruvate dehydrogenase phosphatase catalytic subunit 1 isoform X3, X2, X3	3,3
Atp2b4	plasma membrane calcium-transporting ATPase 4	-2,3	Golph3	Golgi phosphoprotein 3	3,5

Gen	Proteína	Ratio IBAQ	Gen	Proteína	Ratio IBAQ
Adgrg1	G-protein coupled receptor 56	-2,3	Pitpnb	phosphatidylinositol transfer protein beta isoform isoform X2, X1	3,9
Ssr1	translocon-associated protein subunit alpha isoform X2, 1	-2,3	Afg3l2	AFG3-like protein 2	4,0
Psip1	1	-2,3	Klc2	kinesin light chain 2 isoform X2, X1	4,0
Nit2	omega-amidase NIT2	-2,3	Rgs6	regulator of G-protein signaling 6 isoform X3, X	4,1
Ly6h	lymphocyte antigen 6H isoform X2, 1	-2,3	Golga7	golgin subfamily A member 7 isoform X2, X1	4,3
LOC101841805	cytochrome c oxidase subunit 7A2, mitochondrial	-2,3	Atp2b3	Calcium-transporting ATPase	4,5
Crk	adaptor molecule crk isoform X1, 2	-2,3	Ube4b	ubiquitin conjugation factor E4 B isoform X3, X2, X1	5,0
Acot13	acyl-coenzyme A thioesterase 13	-2,3	Vps4a; Fignl1	vacuolar protein sorting-associated protein 4B;	5,0
Hint1	histidine triad nucleotide-binding protein 1	-2,2	Htt	huntingtin	5,4
Ca3	carbonic anhydrase 3	-2,2	Hebp1	heme-binding protein 1	8,1
Ppp3r1	calcineurin subunit B type 1	-2,2	Kcnj10	ATP-sensitive inward rectifier potassium channel 10	10,9
Atp8a1	Phospholipid-transporting ATPase	-2,1	Vgf	neurosecretory protein VGF	12,8
LOC101836740	uncharacterized protein C2orf47 homolog, mitoch	-2,1	Tpmt	thiopurine S-methyltransferase	38,5
Scarb2	Scavenger receptor class B member 2	-2,1	Anapc5	anaphase-promoting complex subunit 5	100,0
LOC101834965	hydroxymethylglutaryl-CoA lyase, mitochondrial	-2,0	Cmpk2	UMP-CMP kinase 2, mitochondrial	100,0
LOC101834210	LOW QUALITY PROTEIN: 40S ribosomal prot	-2,0	Copb2	Coatomer subunit beta'	100,0
Rpl27	60S ribosomal protein L27	-2,0	Cpne5	copine-5 isoform X2, X1	100,0
LOC101833678	hemoglobin subunit beta-like	-2,0	Lcp1, Pls1	plastin-2, plastin-1	100,0
			Lin7a; Lin7b	protein lin-7 homolog A isoform X3, X4; Protein	100,0
			LOC101823821	LOW QUALITY PROTEIN: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like	100,0
			LOC101844314	60S ribosomal protein L13-like isoform X3, X2, X	100,0
			Myo18a	unconventional myosin-XVIIIa	100,0
			Ptp4a1	protein tyrosine phosphatase type IVA 1	100,0
			Slc12a6; Slc12i	solute carrier family 12 member 6 isoform X5, X	100,0
				Smith-Magenis syndrome chromosomal region	
			Smcr8	candidate gene 8 protein	100,0
			Stub1	E3 ubiquitin-protein ligase CHIP	100,0
			Ezr	ezrin	420,0

Tabla 4. Proteínas diferencialmente expresadas identificadas por el método SDS-PAGE-MS. Ratio IBQ control/GASH



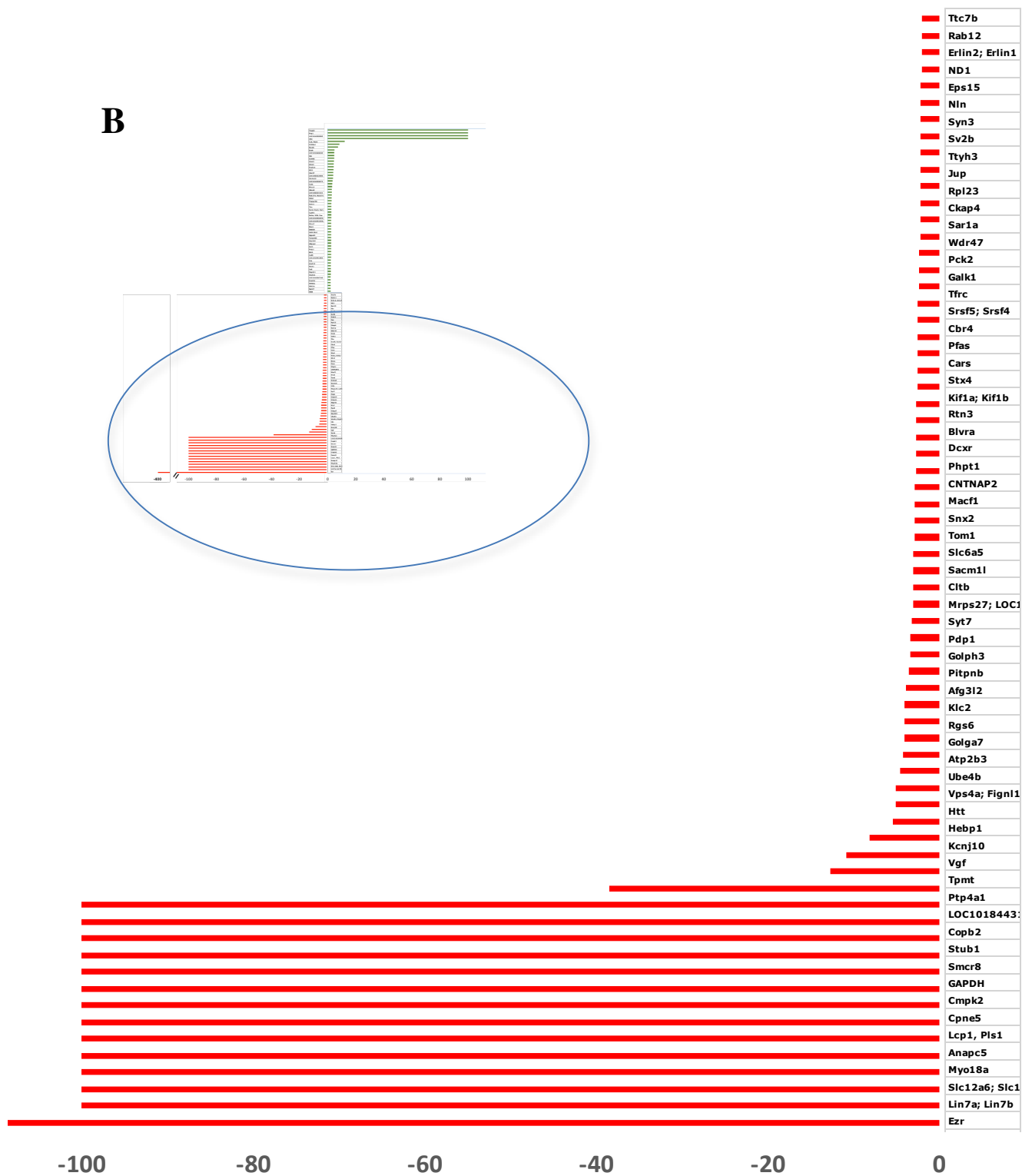


Figura 10. Relación de proteínas diferencialmente representadas en el CI del GASH/Sal en relación a los controles. En verde (**A**) indica que son más abundantes (sobrexpresadas) y en rojo (**B**) las que están en menor cantidad (infraexpresadas) que en el CI de los controles. En la base del histograma, se indica el número de veces en el que se encuentra más o menos representada cada una de las proteínas del estudio.

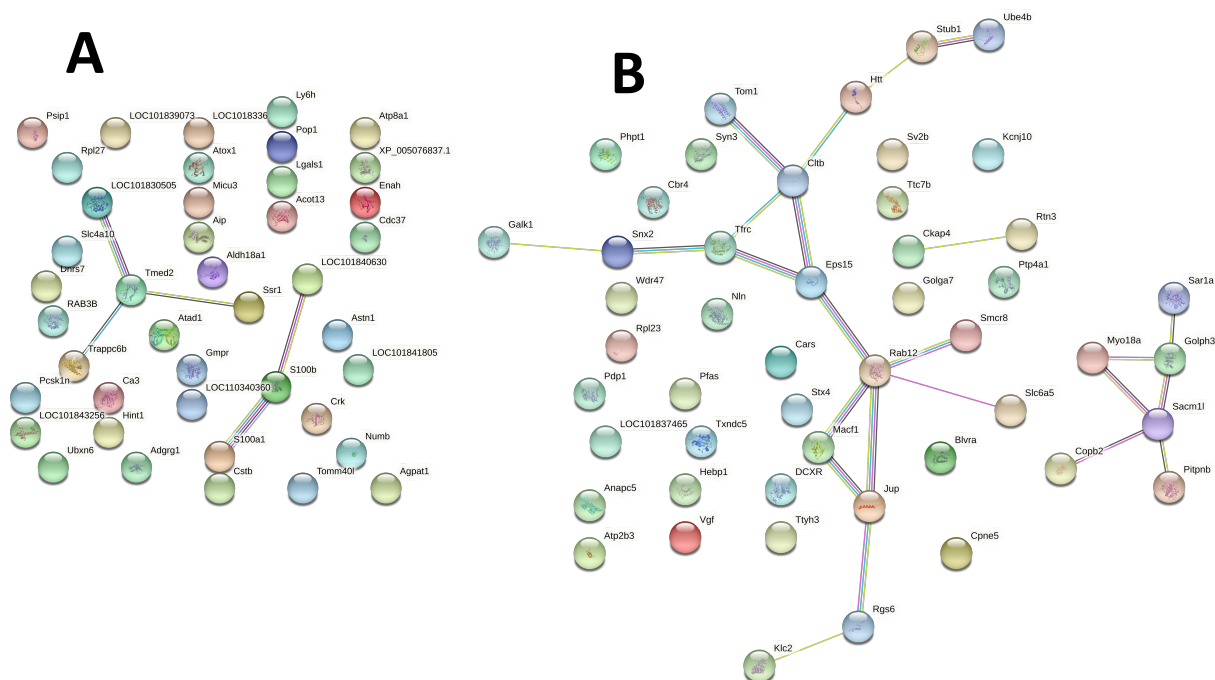


Figura 11. Interacción entre las proteínas diferencialmente expresadas determinadas por la técnica SDS-PAGE.MS A- Sobreexpresadas. B-Infraexpresadas en relación con los controles. Las líneas representan interacciones entre ellas. Esquema obtenido de la página web <http://string-db.org/>

4.1.2.2 Análisis de enriquecimiento funcional

Proteínas sobreexpresadas

No existe ningún termino GO correspondiente a la categoría “función molecular” enriquecido, por lo tanto, nos centraremos en analizar los términos GO correspondientes a la categoría “proceso biológico” (BP), tanto en las proteínas sobreexpresadas como en las infraexpresadas.

Existen dos procesos biológicos muy significativos:

-endocitosis post-sináptica: los genes correspondientes a las proteínas sobreexpresadas son *PPP3R1*, *ATAD1* y *NUMB* (ver significado en anexo 3).

-proceso metabólico de la citrulina. los genes correspondientes a las proteínas sobreexpresadas son *ATP2B4* y *ALDH18A1*.

Además, se encuentra sobreexpresada la proteína NADH-ubiquinona oxidorreductasa (gen MT-ND2), pertenece al complejo I de la cadena de respiración mitocondrial.

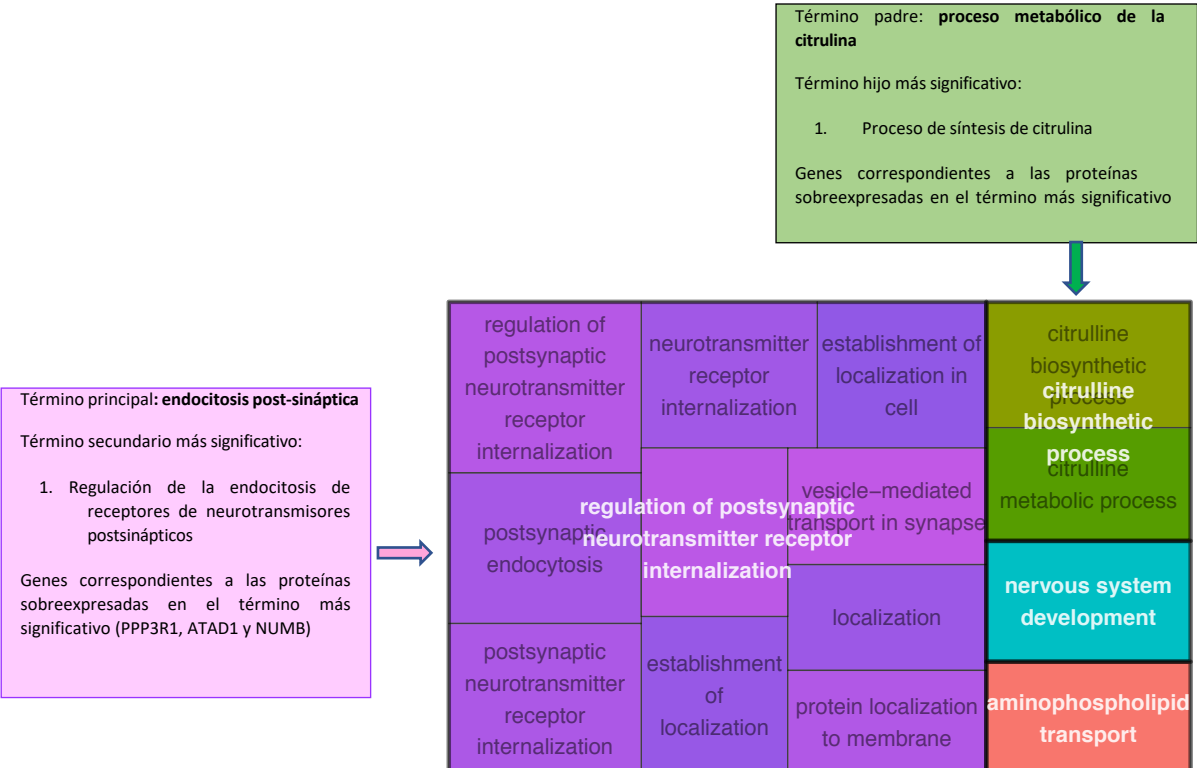


Tabla 5. Términos GO (categoría BP) correspondientes a los genes/proteínas sobreexpresadas en SDS

Los fenotipos asociados a las proteínas significativas encontradas en la base de datos Human Phenotype Ontology se pueden ver en la tabla 14.

Fenotipo	Genes/Proteínas
Cifosis	SCARB2, ALDH18A1, TRIO, ATAD1, AIP, CFL2 y POP1
Coordinación anormal	SCARB2, HINT1, ADGRG1, ALDH18A1, TRIO, TRAPPC6B, CSTB, MT-ND2 y ATAD1
Electroencefalograma con complejos de ondas “polyspike”	SCARB2, ADGRG1 y CSTB
Movimientos involuntarios	SCARB2, HINT1, ADGRG1, ALDH18A1, TRIO, TRAPPC6B, CSTB, MT-ND2 y ATAD1

Tabla 6. Fenotipos enriquecidos en las proteínas sobreexpresadas en SDS

Proteínas infraexpresadas

Mediante la técnica SDS, se detectan numerosas proteínas relacionadas con el transporte y la secreción de sustancias, especialmente con el movimiento mediado por vesículas desde, hacia y dentro del aparato de Golgi. Los genes que se corresponden con las proteínas más significativas en este término son las siguientes:

-COPB2, MYO18A, HTT, GOLGA7, KLC2, PITPNB, GOLPH3, SNX2, MACF1, STX4, SAR1A, EPS15 y TXNDC5

En segundo lugar, podemos resaltar dentro de este bloque otro término muy significativo relacionado con la secreción de insulina. Los genes que se corresponden con las proteínas infraexpresadas son:

-EZR, MYO18A, GOLPH3, PHPT1, STX4 y PCK2.

Por otra parte, existe otro bloque relacionado con el comportamiento. Todos los términos de dicho bloque tienen como proteínas infraexpresadas la huntingtina (gen *HTT*) y la proteína tipo 2 asociada a la contactina (gen *CNTNAP2*).

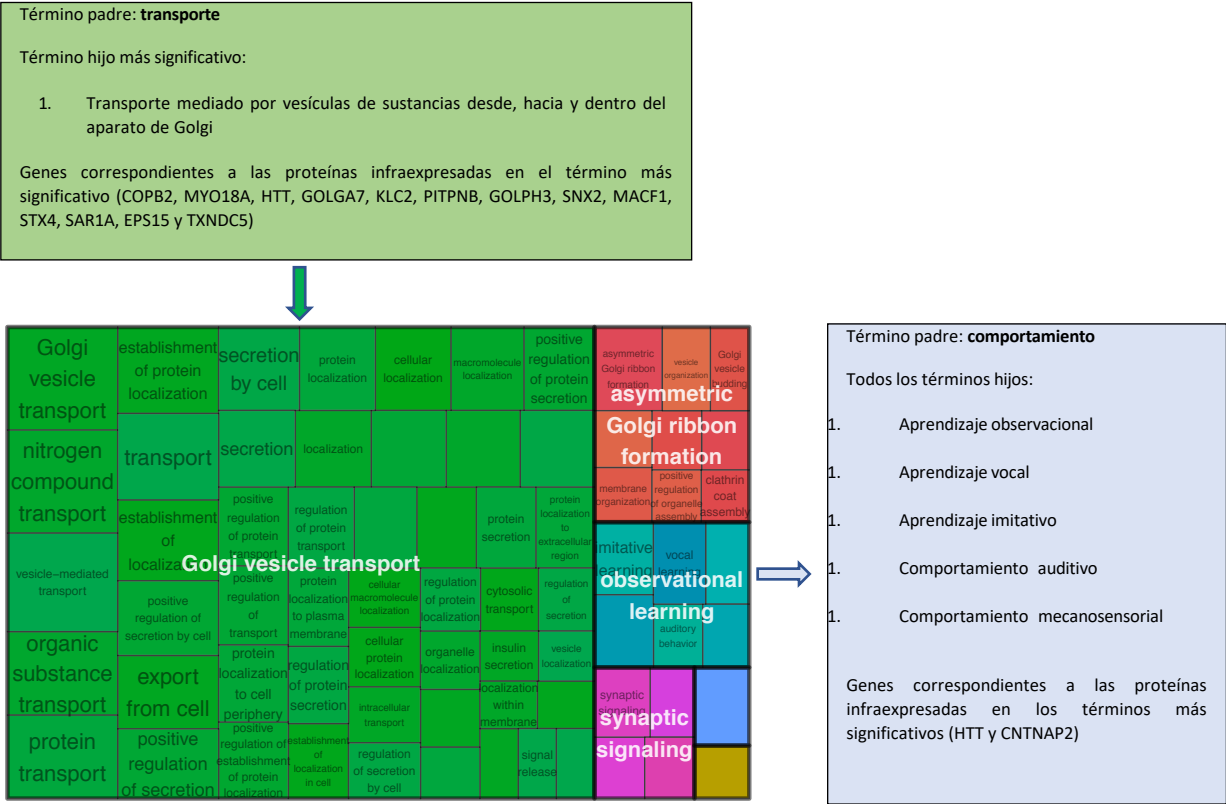


Tabla 7. Términos GO (categoría BP) correspondientes a los genes/proteínas infraexpresadas en SDS

Los fenotipos significativos asociados a las proteínas infraexpresadas se pueden ver en la tabla 8.

Fenotipo	Genes/Proteínas
Clonus aquileo	STUB1, HTT, KIF1A, CARS1 y ERLIN2
Mielinización anormal del Sistema Nervioso Periférico	SLC12A6, KCNJ10, KLC2, KIF1A, MT-ND1

Tabla 8. Fenotipos enriquecidos en las proteínas sobreexpresadas en SDS

4.1.3 SHOTGUN

4.1.3.1 Descripción de proteínas diferencialmente expresadas.

De la mezcla de tejido perteneciente al CI, tanto de controles como de GASH/Sal, se identificaron 1838 péptidos en los CI de los controles y 1779 en el del GASH/Sal, de los cuales 1755 eran comunes. Se comparó la abundancia relativa de cada proteína en los dos grupos a través de sus valores de IBAQ y LFQ obtenidos en el análisis por MAXQUANT. Se estimaron IBAQs para 1825 proteínas en el grupo control y 1744 en el GASH/Sal, de estas 1708 presentaban valores de IBAQ en ambos grupos, habiendo 117 y 36 valores exclusivos para los grupos CONTROL y GASH/Sal respectivamente.

Para conocer las diferencias, se estimó la relación entre los valores de cuantificación IBAQ de cada grupo, obteniéndose 352 grupos de proteínas cuyo valor de IBAQ era mayor del doble en el grupo control. 167 valores de IBAQ estaban disminuidos a la mitad o menos en GASH/Sal. Se evaluó la cantidad relativa mediante SHOTGUN- LC-MS/MS dirigido usando una lista de péptidos únicos seleccionados mediante el software Skyline, teniendo en cuenta los péptidos ya observados. La evaluación de este análisis se realizó usando el software Proteome Discoverer 1.4 y el algoritmo SEQUEST.

En el anexo 2, se encuentra el listado de las proteínas identificadas con al menos dos péptidos totales, mostrando las principales proteínas en el núcleo epileptógeno de los GASH/Sal en relación a los hámsteres controles sirios. Los valores están ordenados de mayor a menor según: ratio IBAQ (control frente a GASH/Sal); en el caso en el que no existe valor de IBAQ (ni de intensidad) en GASH/Sal se ha sustituido por “100”.

De las proteínas que se encuentran en mayor abundancia en los GASH/Sal (sobreexpresadas), 4 no se corresponden con ninguna proteína conocida (5,63%) y entre las que se encuentran en menor cantidad (infraexpresados), hay 14 (22,22%) que no encontramos la equivalencia en las bases de datos analizadas. Indicaremos los datos más importantes, ya que en el apartado 4.3, correlacionaremos todos los datos obtenidos en los diferentes métodos de análisis.

Analizando la distribución de las proteínas encontradas, algunas proteínas se localizan exclusivamente en los controles (tabla 9), mientras que otras, sólo se detectan en el CI del GASH/Sal (tabla 10).

Proteínas exclusivas del CI de controles	
Gen	Proteína
<i>Glg1</i>	Golgi apparatus protein 1 isoform X1
<i>Anxa6</i>	Annexin A6 isoform X1
<i>Ndrp2</i>	Protein ndrp2 isoform x2
<i>Tuba8</i>	Tubulin Alpha 8
<i>Mbp</i>	Myelin basic protein S isoform X1
<i>Ppp1ca</i>	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit isoform X1
<i>Mapre3</i>	Microtubule-associated protein RP/EB family member 3 isoform X1
<i>Sept5</i>	Septin-5 isoform X2
<i>Rdx</i>	Radixin
<i>Hebp1</i>	Heme-binding protein 1
<i>Ehd4</i>	EH domain-containing protein 4
<i>Rac3</i>	Ras-related c3 botulinum toxin substrate 3 isoform x1;
<i>Klc2</i>	Kinesin light chain 2 isoform X1
<i>Usp9x</i>	Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase faf-x isoform x2
<i>Afg3l2</i>	AFG3 Like Matrix AAA Peptidase Subunit 2
<i>Rab6a</i>	RAB6A-GEF complex partner protein 2 isoform X3
<i>Mvp</i>	Major vault protein isoform X1
<i>Clasp1</i>	CLIP-associating protein 1 isoform X1
<i>Coasy</i>	Bifunctional coenzyme A synthase
<i>LOC101826350</i>	Polyadenylate-binding protein; Binds the poly(A) tail of mRNA
<i>Nova1</i>	RNA-binding protein Nova-1-like
<i>Nos1</i>	Nitric oxide synthase; Produces nitric oxide (NO)
<i>Cyfp1</i>	Cytoplasmic fmr1-interacting protein
<i>Dmt1</i>	Dematin isoform X1
<i>Slc12a6</i>	Solute carrier family 12 member 6 isoform X1
<i>Rab11fip5</i>	Rab11 family-interacting protein 5 isoform X1
<i>Pgrmc2</i>	Membrane-associated progesterone receptor component 2
<i>Lin7a</i>	Protein lin-7 homolog
<i>Tfrc</i>	Transferrin receptor protein 1
<i>Rtn4ip1</i>	reticulon-4-interacting protein 1, mitochondrial isoform X1
<i>Mtor</i>	Serine/threonine-protein kinase mtor
<i>Ttyh3</i>	Protein tweety homolog; Probable chloride channel
<i>Cpne5</i>	Copine-5 isoform X2; Copine-5
<i>Acsf3</i>	long-chain-fatty-acid--CoA ligase 3-like isoform X1
<i>Lcp1</i>	Plastin-2
<i>Myo18a</i>	Unconventional myosin-XVIIIa isoform X1
<i>Mapk8</i>	Mitogen-activated protein kinase 8 isoform X3
<i>Pbxip1</i>	Pre-B-cell leukemia transcription factor-interacting protein 1 isoform x5
<i>Plin3</i>	Perilipin-3
<i>Hmgcs1</i>	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase
<i>Tbrg4</i>	Protein TBRG4 isoform X1
<i>Arl3</i>	ADP-ribosylation factor-like protein 3
<i>Guk1</i>	Guanylate kinase isoform X1
<i>Uba3</i>	Regulatory subunit of the dimeric UBA3-NAE1 E1 enzyme
<i>Srcin1</i>	Src kinase signaling inhibitor 1 isoform x13; SRC kinase signaling inhibitor 1

Tabla 9. Proteínas identificadas exclusivamente en el colículo inferior de hámsteres controles

Proteínas exclusivas del CI de GASH/Sal	
Gen	Proteína
<i>Pgk2</i>	Phosphoglycerate kinase 2
<i>Myh9</i>	Myosin-9
<i>Klc4</i>	Kinesin light chain 4
<i>Gnat1</i>	Guanine nucleotide-binding protein G(t) subunit alpha-1
<i>Ppm1e</i>	Protein phosphatase 1E
<i>Bnip2</i>	BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 2 isoform X1
<i>Fam49a</i>	Protein FAM49A
<i>Rnmt</i>	mRNA cap guanine-N7 methyltransferase
<i>Cdk18</i>	Cyclin Dependent Kinase 18
<i>Dars2</i>	
<i>Fkbp2</i>	Peptidylprolyl isomerase; Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP2 isoform X1
<i>Srr</i>	Serine racemase isoform X1
<i>Aip</i>	AH receptor-interacting protein
<i>Gmpr</i>	Gmp reductase
<i>Atox1</i>	Copper transport protein atox1 isoform x2
<i>Slc4a10</i>	Sodium-driven chloride bicarbonate exchanger isoform X1
<i>Gng4</i>	Aspartyl-TRNA Synthetase 2, Mitochondrial
<i>Pcsk1n</i>	proSAAS
<i>Dab2ip</i>	Disabled homolog 2-interacting protein isoform X1
<i>Rab9b</i>	Ras-related protein Rab-9B
<i>Tmed2</i>	Transmembrane emp24 domain-containing protein 2
<i>Srp72</i>	Signal recognition particle subunit srp72
<i>Nudt21</i>	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5
<i>Snx27</i>	Sorting nexin-27 isoform X1
<i>Atad1</i>	ATPase family AAA domain-containing protein 1
<i>Slc24a2</i>	Sodium/potassium/calcium exchanger 2 isoform X3
<i>Itm2c</i>	Integral Membrane Protein 2C
<i>Sdhc</i>	Succinate dehydrogenase cytochrome b560 subunit, mitochondrial
<i>Zer1</i>	Protein zer-1 homolog
<i>Oxsr1</i>	Oxidative Stress Responsive Kinase 1
<i>Cpne5</i>	Copine-5 isoform X2; Copine-5
<i>Acsf3</i>	long-chain-fatty-acid--CoA ligase 3-like isoform X1
<i>Lcp1</i>	Plastin-2
<i>Myo18a</i>	Unconventional myosin-XVIIIa isoform X1
<i>Mapk8</i>	Mitogen-activated protein kinase 8 isoform X3
<i>Pbxip1</i>	Pre-b-cell leukemia transcription factor-interacting protein 1 isoform x5
<i>Plin3</i>	Perilipin-3
<i>Hmgcs1</i>	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase
<i>Tbrg4</i>	Protein TBRG4 isoform X1
<i>Arl3</i>	ADP-ribosylation factor-like protein 3
<i>Guk1</i>	Guanylate kinase isoform X1
<i>Uba3</i>	Regulatory subunit of the dimeric UBA3-NAE1 E1 enzyme
<i>Srcin1</i>	Src kinase signaling inhibitor 1 isoform x13

Tabla 10. Proteínas identificadas exclusivamente en el colículo inferior de hámsteres GASH/Sal

Del resto de las proteínas identificadas, destacan las proteínas mitocondriales (tabla 11) y proteínas del citoesqueleto (tabla 12).

Proteínas mitocondriales en el CI del GASH/Sal		
Gen	Proteína	expresión
<i>Dhtkd1</i>	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component DHKTD1, mitochondrial	down
<i>Gng4</i>	Aspartyl-TRNA Synthetase 2, Mitochondrial	up
<i>Mlycd</i>	malonyl-CoA decarboxylase, mitochondrial	down
<i>Mut</i>	methylnalonyl-CoA mutase, mitochondrial	down
<i>ND2</i>	NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Core Subunit 2	up
<i>ND5</i>	NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Core Subunit 5	down
<i>Ndufb6</i>	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 6 isoform X1	up
<i>Ndufs4</i>	Nadh dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 4, mitochondrial isoform x1	down
<i>Nln</i>	Neurolysin, mitochondrial	down
<i>Nnt</i>	NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial	down
<i>Pcca</i>	propionyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial	down
<i>Rtn4ip1</i>	reticulon-4-interacting protein 1, mitochondrial isoform X1	down
<i>Sirt5</i>	Nad-dependent protein deacylase sirtuin-5, mitochondrial	up

Tabla 11. Algunas proteínas mitocondriales diferencialmente expresadas en el colículo inferior de animales GASH/Sal en relación con los controles.

Proteínas citoesqueléticas en el CI del GASH/Sal		
Gen	Proteína	expresión
<i>Actr10</i>	Actin Related Protein 10	down
<i>Ank3</i>	ankyrin-3 isoform X26	up
<i>Ckap5</i>	Cytoskeleton-associated protein 5	up
<i>Klc4</i>	Kinesin light chain 4	up
<i>Klc4</i>	Kinesin light chain 4	up
<i>Map4</i>	Microtubule-associated protein 4	down
<i>Mapre3</i>	Microtubule-associated protein RP/EB family member 3 isoform X1	up
<i>Myh10</i>	Myosin-10	up
<i>Myh9</i>	Myosin-9	up
<i>Myh9</i>	Myosin-9	up
<i>Myo18a</i>	Unconventional myosin-XVIIIa isoform X1	up
<i>Nefh</i>	Neurofilament heavy polypeptide	up
<i>Sptb</i>	Spectrin Beta	down
<i>Tbce</i>	Tubulin-specific chaperone E isoform X1	down
<i>Tubb6</i>	Tubulin Beta 6 Class V	down

Tabla 12. Proteínas del citoesqueleto diferencialmente expresadas en el colículo inferior de hámsteres GASH/Sal en relación con los controles

4.1.3.2 Análisis de enriquecimiento funcional

Proteínas sobreexpresadas

En los resultados del análisis de enriquecimiento funcional realizado para las proteínas sobreexpresadas en SHOTGUN, podemos destacar dos términos generales correspondientes a la categoría “función molecular”; oxidorreducción y unión a nucleósidos.

Hay un conjunto de proteínas sobreexpresadas (genes *NDUFA5*, *NDUFA4*, *NDUFB6* y *MT-ND2*) que forman parte del complejo I (NADH deshidrogenasa) de la cadena respiratoria mitocondrial, y por tanto estarán asociadas a los procesos de oxidorreducción.

En segundo lugar, destaca un término general “unión a nucleósidos” que cuenta con numerosos términos secundarios (unión a ATP, unión a GDP, unión a nucleótidos de purina etc...). Entre estos términos, el que mayor significación presenta es “unión a nucleósido fosforilado”, siendo los genes correspondientes a las proteínas sobreexpresadas los siguientes:

-SIRT5, UBE2D1, ATP8A1, OLA1, GRHPR, IDE, MYH10, HDGF, RAB4A, NME3, CDK14, PRKAR1B, NT5C, RAB8A, DYNC1LI1, PIP4K2C, SEPTIN9, FARSA, MYO1D, TARS3, PI4KA, UPF1, CSK, ADNJA3, EHD1, PGK2, MYH9, GNAT1, CDK18, DARS2, SRR, RAB9B, ATAD1, ITM2C y OXSR1

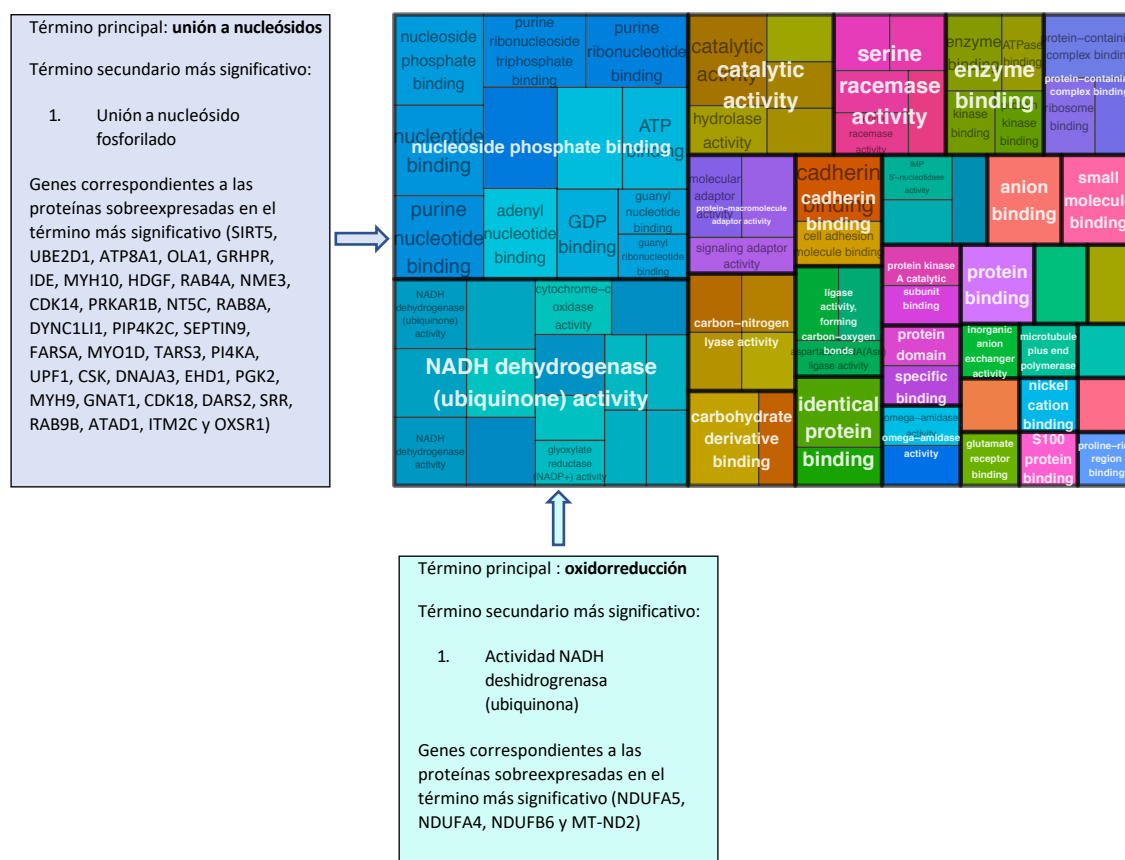


Tabla 13. Términos GO (categoría BP) correspondientes a los genes/proteínas sobreexpresadas en SHOTGUN

Bases de datos	Términos	Genes/Proteínas
KEGG	Regulación del citoesqueleto de actina	MYH10, GSN, CRK, BRK1, MYL12A, PIP4K2C, BAIAP2, PPP1CB y MYH9
KEGG	Esclerosis lateral amiotrófica	COX7A2, NDUFA5, PSMD8, NDUFA4, NDUF6, PSMB4, RAB8A, NEFM, PSMB7, KLC4 y MT-ND2
KEGG	Parkinson	COX7A2, NDUFA5, PSMD8, NDUFA4, NDUF6, PSMB4, PSMB7, KLC4 y MT-ND2
REACTOME	Respuesta inmune innata	WASF3, UBE2D1, ATP8A1, APEH, GSN, CST3, COTL1, DNAJC5, PSMD8, FGB, CRK, PSMB4, BRK1, DYNC1LI1, NIT2, S100B, COPB1, SERPINA1, PSMB7, BAIAP2, RASGRP2, S100A1, MYH9, ATOX1 y RAB9B
REACTOME	Señalización mediada por integrinas	FGB, CRK, RASGRP2 y CSK

Tabla14. Rutas más significativas sobreexpresadas en SHOTGUN

Proteínas infraexpresadas

Entre las proteínas infraexpresadas en la técnica SHOTGUN podemos destacar 3 términos principales correspondientes a la categoría “función molecular”, dichos términos son: “actividad catalítica”, “unión a nucleósidos” y “moléculas de adhesión celular”. Cabe destacar que dentro del grupo “actividad catalítica” se encuentra el término secundario “actividad de oxidorreducción”, cuyas proteínas infraexpresadas se corresponden a los siguientes genes:

- *RTN4IP1, BLVRA, DECR1, CYP46A1, PRDX4, TECR, ACAA1, CRYZ, ACOX1, ETFDH, HSDL1, DHTKD1, ACADSB, PCYOX1L, DCXR, MT-ND5, NDUFS4, CBR4, PCYOX1, TMX3, NDUFC2, BDH1, HMOX2, HSD17B8, TXNL1, HSD11B1, DHRS4, CYB5R1 y TMX2*

Dentro de esta lista, los genes que codifican componentes del complejo I (NADH deshidrogenasa) son:

- *MT-ND5, NDUFS4, NDUFC2*

En la tabla 15, se reflejan los términos principales y secundarios más significativos

Término principal: **moléculas de adhesión celular**

Término ecundario más significativo:

1. Unión a cadherinas

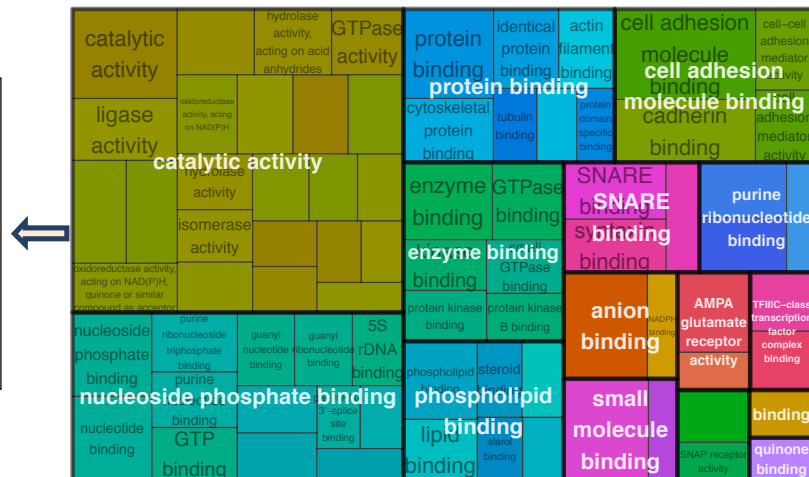
Genes correspondientes a las proteínas infraexpresadas en el término más significativo (PPP1CA, RDX, EHD4, KLC2, PLIN3, EPS15, LYPLA2, CLIC1, MACF1, JUP, EIF3E, PAICS, VCL, CTNNA1, CTNNA2, PACSIN2, BSG, EZR, STXBP6, ARHGAP1 y ADNJB1)

Término principal : **actividad catalítica**

Término secundario más significativo:

1. Actividad ligasa

Genes correspondientes a las proteínas infraexpresadas en el término más significativo (ACSL3, UBA3, ACSL1, LARS1, FARSB, PAICS, CARS1, PFAS, MCCC1, ACSM5, PCCA, HARS1 y ADSS1)



Término principal : **unión a nucleósidos**

Término ecundario más significativo:

1. Unión a nucleósido fosforilado

Genes correspondientes a las proteínas infraexpresadas en el término más significativo (ANXA6, TUBA8, EHD4, RAC3, RAB6A, COASY, MTOR, ACSL3, MYO18A, MAPK8, ARL3, GUK1, UBA3, ACSL1, BLVRA, KIF1A, DECR1, RRAGD, GALK1, KCNJ10, AGAP3, ADNH11, CRY2, BRSK2, ACOX1, ATP2B3, CHORDC1, LARS1, SYN3, ETFDH, SAR1A, FARSB, TUBB6, VPS4B, ACADSB, PAICS, RAB22A, UBE2O, GFM1, NUDT2, CARS1, PFAS, CBR4, MCCC1, CAMK1, FN3KRP, PRKAR1A, BCS1L, HSD17B8, EIF4A1, ACSM5, PCCA, HSD11B1, CYB5R1, HARS1, RHEB, ADSS1, GK, ILK, PAK1, RAB12, GRK2 y CMPK2)

Tabla 15. Términos GO (categoría BP) correspondientes a los genes/proteínas infraexpresadas en SHOTGUN

En la tabla 16, se reflejan las rutas y los fenotipos más significativos asociados a las proteínas infraexpresadas

Bases de datos	Términos	Genes/Proteínas
KEGG	Metabolismo de los ácidos grasos	ACSL3, ACSL1, TECR, ACAA1, ACOX1, ACADSB, CBR4 y HSD17B8
KEGG	Ruta de señalización PPAR	ACSL3, HMGCS1, ACSL1, ACAA1, ACOX1, FABP3, GK y ILK
KEGG	Enfermedad de Huntington	TUBA8, KLC2, MTOR, MAPK8, GRIA4, GRIA3, KCNJ10, HTT, DNAH11, GRIA2, DCTN4, TUBB6, MT-ND5, NDUFS4, PSMD1 y NDUFC2
KEGG	Señalización retrógrada en el sistema endocannabinoide	MAPK8, GRIA4, GRIA3, MGLL, GRIA2, MT-ND5, GABRG2, NDUFS4, SLC17A6 y NDUFC2
REACTOME	Interacción L1CAM	TUBA8, RDX, LYPLA2, SPTBN4, CNTN2, TUBB6, CHL1, SPTB, EZR, ALCAM y PAK1
REACTOME	Activación de receptores AMPA	GRIA4, GRIA3 y GRIA2
REACTOME	Activación de receptores NMDA y eventos post-sinápticos	TUBA8, LIN7A, GRIA4, GRIA3, GRIA2, TUBB6, GIT1, CAMK1 y PRKAR1A
HP	Función anormal del centro motor	KLC2, USP9X, COASY, SLC12A6, RTN4IP1, MTOR, ARL3, VPS51, KIF1A, GALK1, GRIA4, GRIA3, MYPN, KCNJ10, HTRA2, TECR, ADPRS, HTT, DMXL2, MACF1, BRSK2, GRIA2, ACOX1, ATP2B3, GBE1, SLC6A5, ERLIN2, PRRT2, PRUNE1, ATCAY, ASL, VPS53, HEXB, CTNNA2, GFM1, MMUT, CARS1, SPTB, AMPD2, MT-ND5, GABRG2, NDUFS4, PSPH, PPP2R5D, EZR, MCCC1, SLC12A2, ROGDI, NDUFC2, PRKRA, BCS1L, AHI1, TFG, PCCA, HARS1, GFAP, ADSS1, DDC, TMX2 y PAK1

Tabla 16. Rutas más significativas infraexpresadas en SHOTGUN

4.1.4 iTRAQ-8

4.1.4.1 Descripción de proteínas diferencialmente expresadas

Mediante la técnica iTRAQ 8, se identificaron un total de 1435 proteínas bien caracterizadas en el CI de hámsteres controles y GASH/Sal. Para discernir las más importantes y que mayor relevancia pudieran presentar, se llevó a cabo un primer filtrado de proteínas teniendo en cuenta la variable “*p*-valor” aplicada a la expresión diferencial entre los grupos experimentales, aceptando en un primer momento, aquellas proteínas con un valor de $p \leq 0,05$. Para ello, se realizó el volcano plot, para poder ayudar a distinguir de forma gráfica esta separación, donde los resultados obtenidos se observan en la Figura 13. El análisis iTRAQ-8 se llevó a cabo en el Laboratorio de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología CSIC de Madrid.

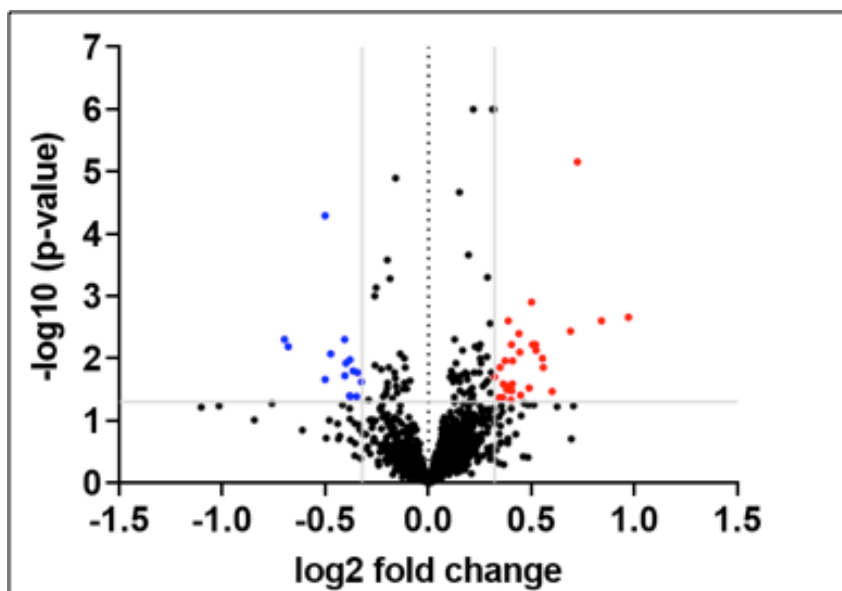


Figura 13. Volcano plot de las proteínas “sobreexpresadas” e “infraexpresadas” en el colículo inferior del GASH/Sal. El eje X muestra la variable “FC”, representada en función logarítmica en base 2. El Eje Y muestra la variable “*p*-valor”, representada en función – logarítmica en base 10. (Elaborado con “GraphPad Prism 8”). Las barras verticales apoyadas sobre el eje de las x, representan el filtrado realizado ($\text{Log}_2 \text{FC} \geq 0,321$), en valores positivos y negativos).

A partir del valor del eje Y, se separan los genes que presentan un *p*-valor $> 0,05$ (hacia abajo, color negro) y los que presentan un *p*-valor $< 0,05$ (hacia arriba, colores negro, rojo y azul). Los valores a la izquierda del “0” en el eje X muestran los genes infraexpresados (color azul, los que presentan *p*-valor $< 0,05$ y un $\text{Log}_2 \text{FC} \leq 0,321$); y los valores a la derecha del “0” muestran los genes sobreexpresados (color rojo, los que presentan un *p*-valor $< 0,05$ y un $\text{Log}_2 \text{FC} \geq 0,321$).

Para llevar a cabo esta delimitación, se siguió el protocolo establecido por Qin et al., 2017, en el que se indicaba que se aceptaban las proteínas sobreexpresadas con un $\text{Log}_2 \text{FC}$ por encima de 0,321; y las proteínas infraexpresadas con un $\text{Log}_2 \text{FC}$ menor de -0,321, delimitándose un total de

45 proteínas que se ajustan a estos parámetros (Tabla 17), que se adhieren al protocolo delimitado por las variables p -valor y $\text{Log}_2 \text{FC}$.

Genes	Proteínas	Expresión
<i>Abhd12</i>	Abhydrolase Domain Containing 12, Lysophospholipase	up
<i>Atp1a1</i>	Sodium/Potassium-Transporting ATPase Subunit Alpha-1	down
<i>Atp4a</i>	ATPase H+/K+ Transporting Subunit Alpha	down
<i>Atxn10</i>	Ataxin 10	up
<i>Ca14</i>	Carbonic Anhydrase 14	up
<i>Caskin1</i>	Caskin-1	up
<i>Clic4</i>	Chloride Intracellular Channel Protein 4	down
<i>Clybl</i>	Citrate Lyase Subunit Beta-Like Protein, Mitochondrial	down
<i>Ddah1</i>	Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase 1	up
<i>Dlg1</i>	Disks Large Homolog 1	up
<i>Eci2</i>	Enoyl-CoA Delta Isomerase 2	up
<i>Eps15l1</i>	Epidermal Growth Factor Receptor Substrate 15-Like 1	up
<i>Farsa</i>	Phenylalanine--TRNA Ligase Alpha Subunit	up
<i>Gaa</i>	Lysosomal Alpha-Glucosidase	up
<i>Gapdh</i>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like	down
<i>Gcat</i>	2-Amino-3-Ketobutyrate Coenzyme A Ligase, Mitochondrial	up
<i>H1-2</i>	histone H1.2	down
<i>H1-4</i>	histone H1.4	down
<i>Hint2</i>	Histidine Triad Nucleotide-Binding Protein 2, Mitochondrial	up
<i>Hspg2</i>	Basement Membrane-Specific Heparan Sulfate Proteoglycan Core Protein	up
<i>Isoc2a</i>	Isochorismatase domain-containing protein 2A	down
<i>Kiaa1468</i>	RAB11 Binding And LisH Domain, Coiled-Coil And HEAT Repeat Containing	up
<i>Lamb2</i>	Laminin Subunit Beta-2	up
<i>Lym4</i>	LYR Motif-Containing Protein 4	up
<i>Mat2a</i>	S-Adenosylmethionine Synthase Isoform Type-2	up
<i>Mobp</i>	Myelin-Associated Oligodendrocyte Basic Protein	down
<i>Mpst</i>	Mercaptopyruvate Sulfurtransferase	up
<i>Mtfr1l</i>	Mitochondrial Fission Regulator 1-Like	down
<i>Ngb</i>	Neuroglobin	up
<i>Pfkl</i>	ATP-Dependent 6-Phosphofructokinase, Liver Type	up
<i>Pgm2l1</i>	Glucose 1,6-Bisphosphate Synthase	down
<i>Ppm1b</i>	Protein Phosphatase 1B	down
<i>Prkcsb</i>	Glucosidase 2 Subunit Beta	up
<i>Psmb3</i>	Proteasome 20S Subunit Beta 3	up
<i>Ptgr2</i>	prostaglandin-E(2) 9-reductase-like isoform X1	up
<i>Rps29</i>	40S ribosomal protein S29	up
<i>Ruvbl1</i>	RuvB Like AAA ATPase 1	up
<i>Sirpa</i>	Tyrosine-Protein Phosphatase Non-Receptor Type Substrate 1	down
<i>Slc27a4</i>	Long-Chain Fatty Acid Transport Protein 4	down
<i>Stoml2</i>	Stomatin-Like Protein 2, Mitochondrial	up
<i>Sub1</i>	Activated RNA Polymerase II Transcriptional Coactivator P15	up
<i>Tll5</i>	Tubulin Polyglutamylase TTLL5	up
<i>Ubqln2</i>	Ubiquilin-2	down
<i>Vamp3</i>	Vesicle-Associated Membrane Protein 3	up
<i>Vars</i>	Valine-TRNA Ligase	up

Tabla 17. Listado de proteínas diferencialmente expresadas identificadas por el método iTRAQ 8, delimitado por las variables p -valor y $\text{Log}_2 \text{FC}$ -MS.

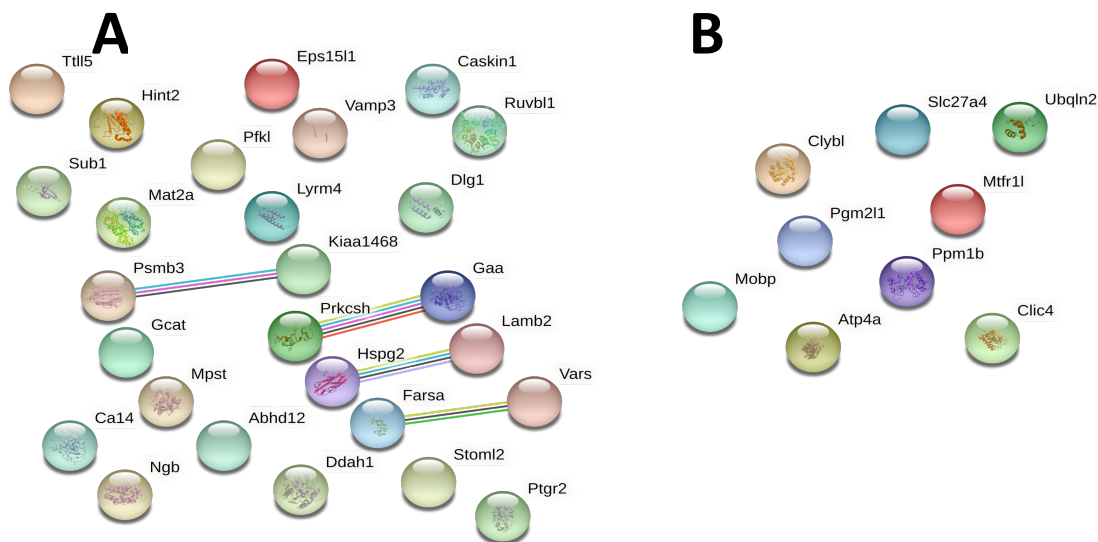


Figura 14. Interacción entre las proteínas diferencialmente expresadas determinadas por la técnica iTRAQ 8. A- Sobreexpresadas. B-Infraexpresadas en relación con los controles. Las líneas representan interacciones entre ellas. Esquema obtenido de la página web <http://string-db.org/>

4.1.4.2 Análisis de enriquecimiento funcional

Proteínas sobreexpresadas

En relación con los procesos GO correspondientes a la categoría “función molecular (MF)”, encontramos proteínas codificadas por los genes *NDUFA4*, *NDUFA5* y *NDUFS8* que están implicados en procesos de oxidorreducción. Por otra parte, existen genes asociados con la unión y edición del tRNA (*VARSI*, *AARS1* y *FARSA*), que intervienen en el proceso de traducción del mRNA a proteína (Tabla 17).

Mirando en la base de datos WikiPathways en relación a estos genes, hay dos términos relacionados con rutas biológicas que han resultado ser significativos

1. Diferenciación de células gliales. Las proteínas sobreexpresadas se relacionan con los genes *MBP* y *MSN*
2. Trans-sulfuración. Las proteínas sobreexpresadas se relacionan con los genes *MPST* y *AHCY*.

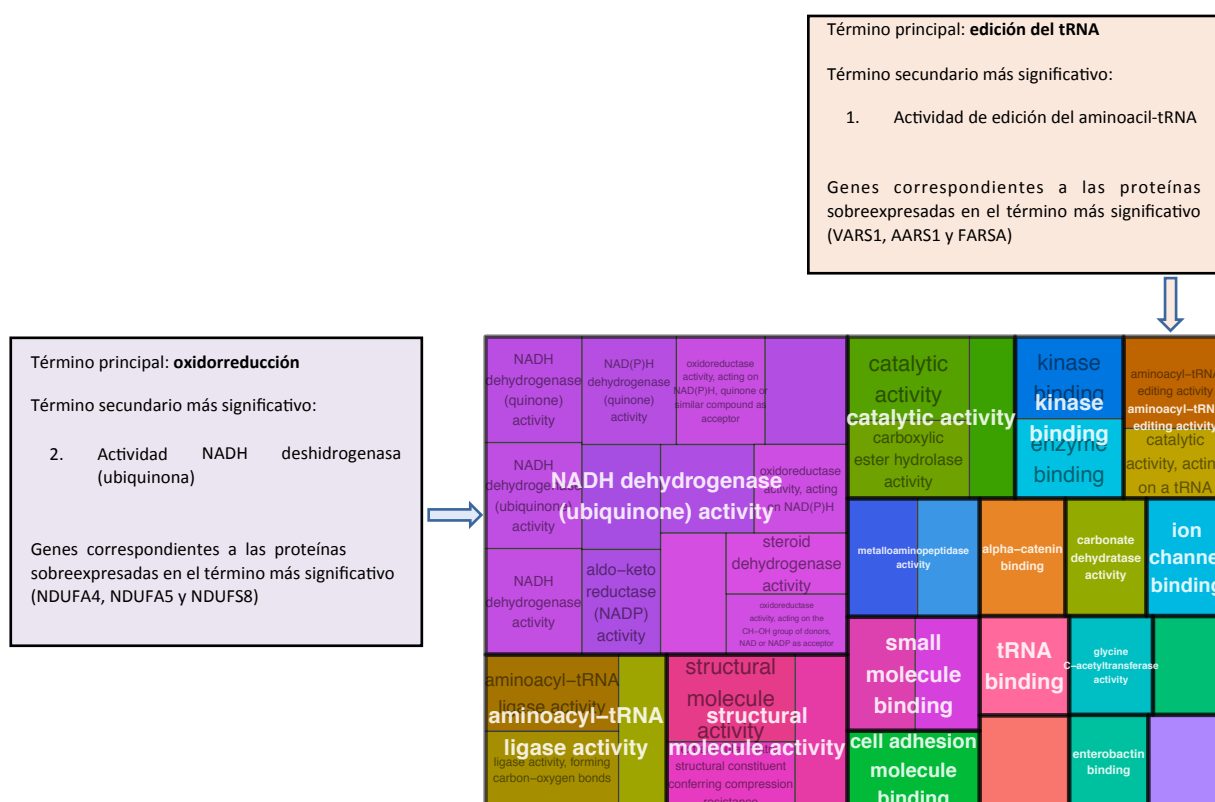


Tabla 18. Términos GO (categoría MF) correspondientes a los genes/proteínas sobreexpresadas en ITRAQ. El término más significativo de cada bloque se destaca en color blanco

Proteínas infraexpresadas

Destacan las ligadas al transporte activo de sodio y potasio gracias a la hidrólisis de ATP. Estas proteínas están codificadas por los *ATP1A1*, *ATP1B1* y *ATP4A*.

Por otra parte, existe otro término muy significativo relacionado con la regulación de la expresión génica (a nivel de nucleosomas). Los genes/proteínas infraexpresados que pertenecen a este grupo son: *H1-2*, *H3-3B* y *H1-4*. En concreto, estas proteínas están involucradas en la regulación negativa del silenciamiento génico.

Algunas de las rutas más significativas que se encuentran infraexpresadas en ITRAQ, así como los genes (proteínas) que participan en las mismas se pueden ver en la tabla 20:

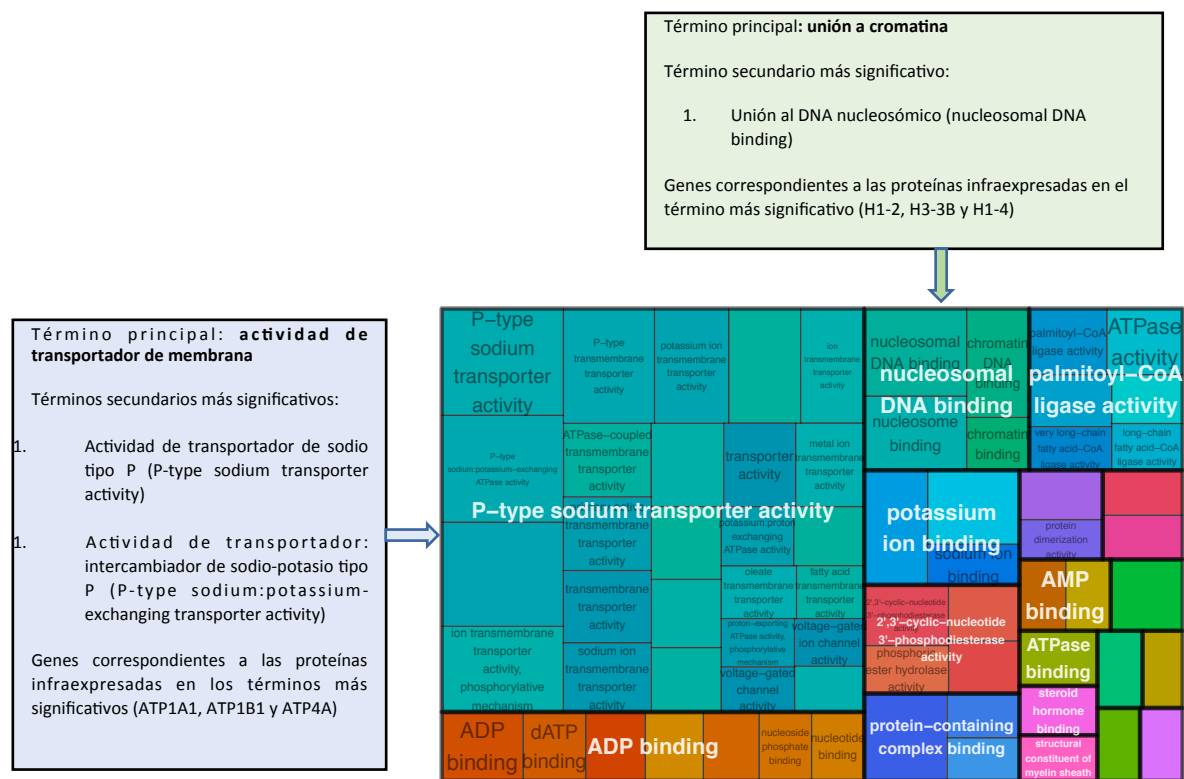


Tabla 19. Términos GO (categoría MP) correspondientes a los genes/proteínas infraexpresadas en ITRAQ

Base de datos	Término	Genes
KEGG	Ruta de señalización <u>cGMP-PKG</u>	ATP1A1, ATP1B1, PPP3CA y GNAI2
KEGG	Secreción de <u>insulina</u>	SNAP25, ATP1A1 y ATP1B1
REACTOME	Transporte de iones por <u>ATPasas tipo P</u> (comentada anteriormente)	ATP1A1, ATP1B1 y ATP4A
REACTOME	<u>Apoptosis inducida por fragmentación del DNA</u>	H1-2 y H1-4
WikiPathways	<u>Diferenciación de células gliales</u> (algunos genes/proteínas de esta ruta se encuentran sobreexpresados en ITRAQ como vimos anteriormente)	CNP (tercera proteína más abundante de la mielina del Sistema Nervioso Central) y PLP1
WikiPathways	<u>Especificación y diferenciación de oligodendrocitos</u> (generación de componentes de la mielina para el Sistema Nervioso Central)	CNP y PLP1

Tabla 20. Fenotipos enriquecidos y rutas más significativas de las proteínas sobreexpresadas en iTRAQ8

4.2 Diferencias proteicas del CI entre el hámster control y el GASH/Sal en condiciones basales y tras las crisis convulsivas. DIGE

Se planteó realizar el análisis diferencial de las proteínas mediante DIGE, ya que esta técnica combina el poder resolutivo de la electroforesis bidimensional con la sensibilidad de marcajes fluorescentes y un análisis de imagen con software específico. Los análisis se realizaron en el instituto de biotecnología (INBIOTEC) de León.

En la figura 15, se muestran las combinaciones de marcaje realizando dye-swap (intercambio de marcaje) y dos ejemplos de geles fluorescentes resultantes del análisis de DIGE.

Para el análisis de DIGE se establecieron como límites de corte: i) p-value <0.05; ii) ratio de cambio (inducción o represión) <-1.5 ó >1.5 y iii) presencia en el 70% de las imágenes (15/18). Como combinaciones de análisis se utilizaron: i) GN / GE (2 proteínas diferencialmente expresadas); ii) CN / CE (2 proteínas diferencialmente expresadas); iii) CN / GN (32 proteínas diferencialmente expresadas); iv) CE / GE (16 proteínas diferencialmente expresadas). De todas las proteínas diferencialmente expresadas se eliminaron del recuento las duplicadas por lo que quedaron 39 proteínas de interés. Sobre éstas, se determinó aquellas que fuesen factible escindir las del gel, lo que dejó un número final de 24 proteínas a identificar (Tabla 21).

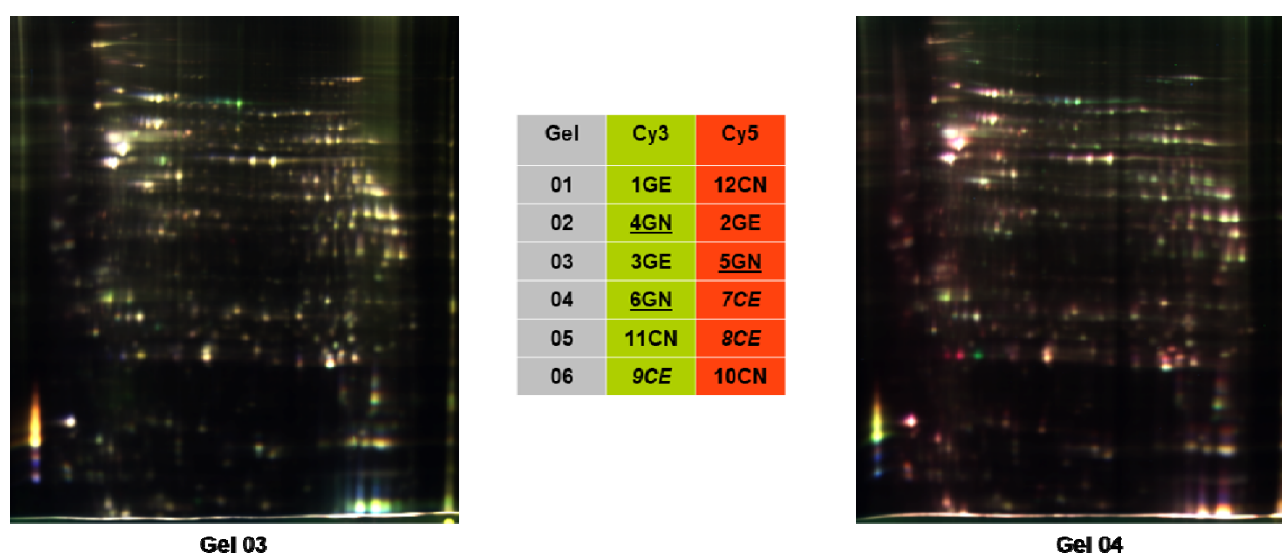


Figura 15. Combinaciones de las réplicas biológicas de las diferentes condiciones utilizadas para el marcaje DIGE con los fluoróforos Cy3 o Cy5. Se muestran como ejemplo los geles 3 y 4.

El análisis de componentes principales (Fig. 16) no refleja unas diferencias drásticas entre las condiciones analizadas, lo que coincide con el número total de proteínas seleccionadas para identificar como diferencialmente expresadas. Aunque sí parece verse una división entre las proteínas procedentes de los animales control (C) y los animales GASH (G) (izquierda-derecha de la imagen del análisis de componentes).

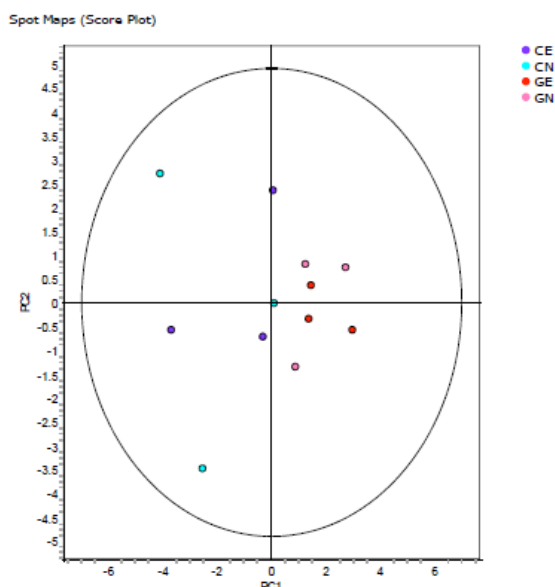


Figura 16. Análisis de componentes principales de los resultados del DIGE.

Identificación de proteínas diferencialmente expresadas

Aquellas proteínas detectadas en los análisis DIGE como diferencialmente expresadas se extrajeron del gel para su digestión. En el proceso de extracción, varias de las seleccionadas fueron imposibles de extraer debido a su tenue presencia en los geles DIGE. Es por ello, que de las 24 proteínas candidatas para digerir únicamente se pudieron obtener 21.

La digestión para obtener la huella peptídica se llevó a cabo según lo descrito por Havlis y colaboradores (2003) mediante el uso de tripsina. Los productos de digestión se analizaron mediante un espectrómetro de masas tipo MALDI TOF/TOF y los espectros obtenidos se utilizaron para identificar las proteínas mediante el motor de búsqueda MASCOT. Como base de datos se utilizó NCBI nr frente a todas sus entradas (139213787 sequences; 51013024959 residues). Únicamente en aquellas búsquedas que no aparecía hámster (*Mesocricetus auratus*) entre las primeras 50 proteínas, se filtró la taxonomía por Rodentia.

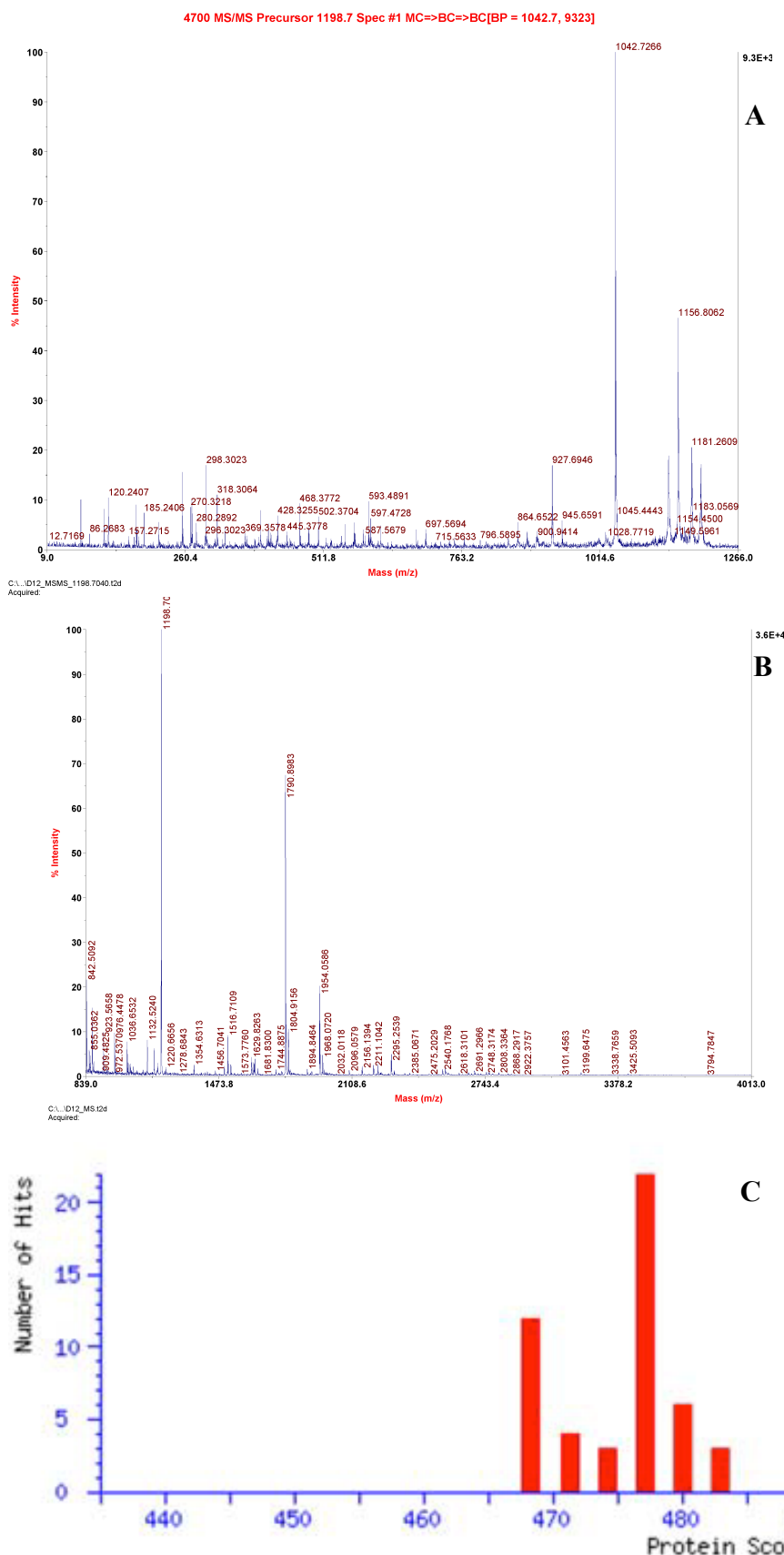


Figura 17. Identificación de la mancha proteica 1247. A- espectro de fragmentación del péptido de masa 1198.7040. B- Huella peptídica de la proteína 1247. C- Histograma de probabilidades de identificación proteica. El histograma representa la cantidad de proteína según el algoritmo Mascot. En ordenadas, se representa el $-10 \cdot \log(P)$, donde P es la probabilidad de que se observe una coincidencia de la muestra con las proteínas de la base de datos. Los valores proteicos mayores de 94 son significativos ($p < 0.05$). En ordenadas, el número de coincidencias (del inglés, number of hits).

Así, se lograron identificar 9 proteínas que corresponden a 6 proteínas diferentes, ya que también hay isoformas diferencialmente expresadas de la misma proteína (Tabla 21).

		p-value <0.05, ratio<-1.5 / >1.5					
P.I. estimado	PM estimado (Da)	proteína	GN / GE	CN / CE	CN / GN	CE / GE	Identification
4,68	224892	56		-1,58		1,79	N/A
5,44	224892	62	1,54				N/A
5,22	119582	270			-2,1		N/A
5,04	110568	292				1,67	N/A
7,1	80668	526			-1,63		N/A
7,53	76731	622				-1,85	N/A
6,68	64936	856			-1,76		N/A
7,19	64175	864			-1,52		pyruvate kinase PKM [Mesocricetus auratus]
6,09	58410	965			-1,61		N/A
4,64	46131	1164				-1,52	N/A
6,17	44497	1214			-1,62		N/A
5,39	43563	1247			-1,67		Actin, cytoplasmic 1 (RODENTIA)
5,44	43436	1248			-1,65		Actin, cytoplasmic 1 (RODENTIA)
5,35	43499	1251			-1,56		Actin, cytoplasmic 1 (RODENTIA)
4,95	34379	1623			-1,63		N/A
4,4	32598	1695				1,51	N/A
4,19	31485	1752			2,04		N/A
5,07	31327	1755			1,81		N/A
5,27	29036	1849			1,62		N/A
7,78	27627	1932			1,83		N/A
5,01	25383	2024			-1,53		ATP synthase beta subunit [Mesocricetus auratus]
5,52	24807	2045			1,9	1,61	N/A
5,35	24228	2070			1,59	1,99	N/A
7	22730	2117				1,7	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial [Mesocricetus auratus]
4,95	22388	2129			2,27	1,95	N/A
4,69	22142	2149			1,7		N/A
5,31	21809	2155			1,54	-8,06	peroxiredoxin-2 [Mesocricetus auratus]
5,13	21689	2164			-9,62	4,05	peroxiredoxin-2 [Mesocricetus auratus]
4,98	21600	2170			3,67	5,28	N/A
4,84	21630	2176			4,4	2,55	N/A
5,05	20851	2210			2,19	1,67	N/A
5,81	19353	2264			1,69		N/A
5,81	18630	2279			1,64		N/A
5,17	18158	2301		2,28			N/A
5,16	17264	2351	1,52			1,92	anti-dectin-1 15E2 light chain [Mus musculus] (Rodentia)
5,07	17045	2359			1,71		N/A
4,78	16903	2369			1,63		N/A
4,54	16091	2436			1,55		N/A
4,09	15912	2449			1,6	1,73	N/A
5,71		2582			1,68		N/A

Tabla 21. Tabla resumen de las proteínas expresadas diferencialmente identificadas mediante MASCOT. Se indica posición según geles DIGE, puntuación de MASCOT (score), identificación, Punto isoeléctrico (P.I.) y peso molecular (PM).

4.3 Análisis proteómico comparativo

4.3.1 Ortólogos encontrados en la especie *Homo sapiens*

1. ITRAQ

- Existen 54 genes humanos que tienen ortólogos en los 65 genes relacionados con las proteínas sobreexpresadas en el modelo GASH/Sal respecto del control
- Existen 16 genes humanos que tienen ortólogos en los 23 genes relacionados con las proteínas infraexpresadas en el modelo GASH/Sal respecto del control.

2. SDS-PAGE-MS

- Existen 48 genes humanos que tienen ortólogos en los 58 genes relacionados con las proteínas sobreexpresadas en el modelo GASH/Sal respecto del control

- Existen 62 genes humanos que tienen ortólogos en los 67 genes relacionados con las proteínas infraexpresadas en el modelo GASH/Sal respecto del control

3. SHOTGUN

- Existen 132 genes humanos que tienen ortólogos en los 163 genes relacionados con las proteínas sobreexpresadas en el modelo GASH/Sal respecto del control

- Existen 312 genes humanos que tienen ortólogos en los 352 genes relacionados con las proteínas infraexpresadas en el modelo GASH/Sal respecto del control

4.3.2 Proteínas comunes

Se identificaron los PDEs (proteínas diferencialmente expresadas) que son comunes en los distintos métodos de detección y cuantificación de proteínas. Los resultados se presentan en dos tablas comparativas, una con los genes/proteínas sobreexpresados y otra con los infraexpresados.

	PROTEÍNAS/GENES SOBREEXPRESADOS	(%) de coincidencia
Comunes en ITRAQ y SDS	H4C12	1/48=2.08%
Comunes en ITRAQ y SHOT GUN	NDUFA4 NDUFA5 H4C12 FARSA	4/54=7.4%
Comunes en SDS y SHOT GUN	ATP8A1 CA3 ACOT13 CRK COX7A2 LY6H NIT2 AGPAT1 DHRS7 H2BC18 H4C12 NEFM FXR2 ASTN1 TRAPPC6B GMPR UBXN6 SLC4A10 MT-ND2 PCSK1N ATOX1 ATAD1 S100B AIP S100A1 CSK ARL17A TMED2	28/48=58.33%
COMUNES EN LOS TRES MÉTODOS	H4C12	-

Tabla 22. Proteínas diferencialmente sobreexpresadas comunes en los diferentes métodos de análisis

	PROTEÍNAS/GENES INFRAEXPRESADOS	(%) de coincidencia
Comunes en ITRAQ y SDS	No se encuentran coincidencias	0%
Comunes en ITRAQ y SHOT GUN	PGM2L1	1/16=6.25%
Comunes en SDS y SHOT GUN	EZR PTP4A1 SMCR8 CMPK2 CPNE5 LCP1 MYO18A SLC12A6 LIN7A VGF KCNJ10 HEBP1 HTT VPS4B UBE4B ATP2B3 GOLGA7 RGS6 KLC2 GOLPH3 SYT7 SACM1L SLC6A5 TOM1 MACF1 PHPT1 DCXR BLVRA RTN3 KIF1A STX4 CARS1 PFAS CBR4 SRSF5 TFRC GALK1 SAR1A CKAP4 JUP TTYH3 SV2B SYN3 NLN EPS15 ERLIN2	49/62%=79.03%
	RAB12 TTC7B GRK2	
COMUNES EN LOS TRES MÉTODOS	No se encuentran coincidencias	0%

Tabla 23. Proteínas diferencialmente infraexpresadas comunes en los diferentes métodos de análisis. El número del denominador del apartado “(%) de coincidencia” se corresponde al método de detección que presenta menos PDEs

4.3.3 Análisis comparativo de los tres métodos

•Genes/Proteínas sobreexpresados

La única coincidencia destacable en las proteínas sobreexpresadas se produce entre los métodos ITRAQ y SHOTGUN. Ambos comparten términos relacionados con el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial. Entre estos términos similares se encuentran “actividad NADH deshidrogenasa (ubiquinona)”, “actividad NADH deshidrogenasa (quionona)”, “complejo NADH deshidrogenasa”, “respirasoma mitocondrial” etc... Recordemos que las proteínas sobreexpresadas en ITRAQ se corresponden con los genes *NDUFA4*, *NDUFA5* y *NDUFS8* y que las proteínas sobreexpresadas en SHOTGUN se corresponden con los genes *NDUFA4*, *NDUFA5*, *NDUFB6* y *MT-ND2*.

•Genes/Proteínas infraexpresados

I-Comparativa entre ITRAQ y SHOTGUN

En la comparativa entre estos dos métodos podemos destacar dos términos comunes.

El primero se corresponde con la categoría GO “función molecular”, siendo dicho término “unión a nucleósido fosforilado”. Las proteínas infraexpresadas en ITRAQ se corresponden con los genes *CNP*, *SLC27A4*, *ATP1A1*, *ATP4A*, *GNAI2* y *H1-4*, mientras que en SHOTGUN el número de proteínas infraexpresadas es muy elevando. Los genes son los siguientes:

- o *ANXA6*, *TUBA8*, *EHD4*, *RAC3*, *RAB6A*, *COASY*, *MTOR*, *ACSL3*, *MYO18A*, *MAPK8*, *ARL3*, *GUK1*, *UBA3*, *ACSL1*, *BLVRA*, *KIF1A*, *DECRI*, *RRAGD*, *GALK1*, *KCNJ10*, *AGAP3*, *ADNH11*, *CRYZ*, *BRSK2*, *ACOX1*, *ATP2B3*, *CHORDC1*, *LARS1*, *SYN3*, *ETFDH*, *SARIA*, *FARSB*, *TUBB6*, *VPS4B*, *ACADSB*, *PAICS*, *RAB22A*, *UBE2O*, *GFM1*, *NUDT2*, *CARS1*, *PFAS*, *CBR4*, *MCCC1*, *CAMK1*, *FN3KRP*, *PRKARIA*, *BCS1L*, *HSD17B8*, *EIF4A1*, *ACSM5*, *PCCA*, *HSD11B1*, *CYB5R1*, *HARS1*, *RHEB*, *ADSS1*, *GK*, *ILK*, *PAK1*, *RAB12*, *GRK2* y *CMPK2*

El segundo término (“diferenciación de oligodendrocitos”) se corresponde con la categoría GO “proceso biológico”. Las proteínas infraexpresadas en ITRAQ se relacionan con los genes *CNP* y *PLP1*, mientras que en SHOTGUN los genes son: *MTOR*, *KCNJ10*, *SRSF1*, *CNTN2*, *PTPRZ1*, *RHEB* y *CD9*.

II-Comparativa entre SDS y SHOTGUN

La similitud más destacable entre estos dos métodos se corresponde con el transporte de vesículas hacia, dentro y desde el órgano de Golgi. Las proteínas infraexpresadas en SDS se corresponden con los genes *COPB2*, *MYO18A*, *HTT*, *GOLGA7*, *KLC2*, *PITPNB*, *GOLPH3*, *SNX2*, *MACF1*, *STX4*, *SARIA*, *EPSI5* y *TXNDC5*, mientras que en SHOTGUN los genes son:

- o ***KLC2, RAB6A, ACSL3, MYO18A, ARL3, CLVS2, VPS51, EPS15, STX4, GOLPH3, SPTBN4, HTT, MACF1, PPP6C, DCTN4, SCAMP1, SARIA, GOLGA7, COPA, VAMP3, TMED9, SEC22B, GGA1, SPTB, ANKFY1, STXBP6, TFG, PDCD6***

III-Comparación entre los tres métodos

En los tres métodos existen términos comunes relacionados con la señalización en la sinapsis. Dichos términos se corresponden a la categoría GO “proceso biológico” y son:

- o Señalización sináptica
- o Señalización anterógrada trans-sináptica
- o Transmisión química de la sinapsis
- o Señalización trans-sináptica

Como ejemplo veremos el término “señalización anterógrada trans-sináptica”.

Las proteínas infraexpresadas en ITRAQ (genes: *CNP, SNAP25, PPP3CA, GNAI2* y *PLP1*) no presentan coincidencias con los otros dos métodos. Sin embargo, entre los métodos SDS y SHOTGUN sí que existen:

- o **SDS** *SLC12A6, LIN7A, VGF, KCNJ10, SYT7, SLC6A5, STX4, SV2B* y *SYN3*
- o **SHOTGUN** *MBP, RAC3, CYFIP1, SLC12A6, LIN7A, MTOR, STX4, CYP46A1, GRIA4, GRIA3, KCNJ10, NLGN1, SV2C, CNTN2, STXBP3, VGF, GRIA2, SYT7, CPLX2, SLC6A5, SYN3, PRRT2, PLCL1, GIT1, SNCG, PACSIN2, GABRG2, TPBG, SLC17A6, SLC12A2, CAMK1, PRKAR1A, SV2B, PTPRS* y *GFAP*

4.4 **Expresión génica en el colículo inferior de las proteínas diferencialmente expresadas.**

Se escogieron algunas PDE de los diferentes métodos de análisis para realizar un análisis de expresión de los genes que las codifican en los GASH/Sal frente a los controles.

En general, se ha observado que presentan mayor expresión relativa de mRNA en los controles que en los GASH/Sal, los genes *Ngb, Abhd12, Ttl5* y *Atxn10* (que codifican proteínas sobreexpresadas) y los genes *Pgm2l1* y *Clic4* (que codifican las proteínas infraexpresadas). Por el contrario, presentan mayor expresión relativa de mRNA en los GASH/Sal que, en los controles, los genes *Lamb2, Vamp3, Gtps1, Arf2, Pop1, Tmed2* y *Cfl2* (que codifican proteínas sobreexpresadas) y los genes *Mtfr1l* y *Slc27a4* *Clic4* (que codifican las proteínas infraexpresadas).

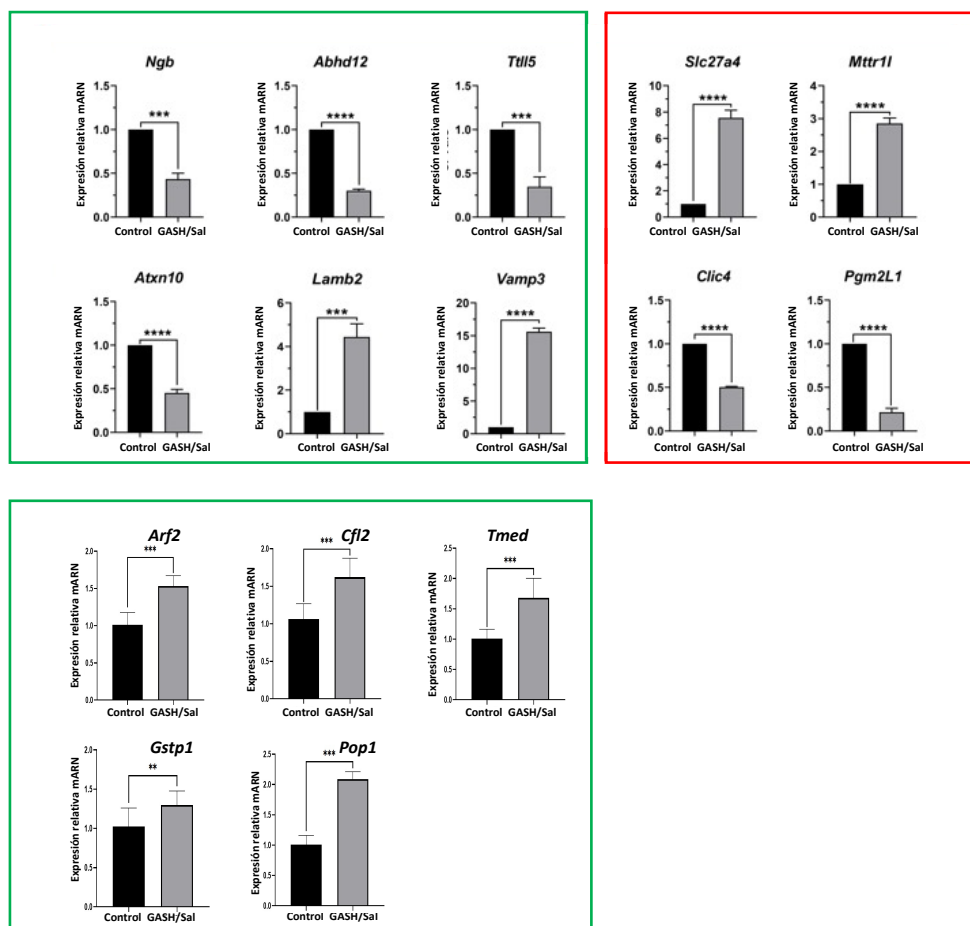


Figura 18. RT-qPCR de los genes que codifican las proteínas diferencialmente expresadas en el colículo inferior de controles y GASH/Sal en estado basal, en el recuadro verde se encuentran los sobreexpresados a partir del análisis de proteómica; y en el recuadro rojo se encuentran los infraexpresados a partir del análisis de proteómica. **Abreviaturas:** *Abhd12*- Abhydrolase Domain Containing 12; *Atxn10*- Ataxin 10; Lysophospholipase; *Clic4*-Chloride Intracellular Channel Protein 4; *Lamb3*- Laminin Subunit Beta-2; *Mtrr1l*- Mitochondrial Fission Regulator 1-Like; *Ngb*- Neuroglobin; *Pgm2L1*- Glucose 1,6-Bisphosphate Synthase; *Slc27a4*-Long-Chain Fatty Acid Transport Protein 4; *Ttl5*- Tubulin Polyglutamylase TTLL5; *Vamp3*- Vesicle-Associated Membrane Protein 3. (Genes que codifican PDEs visualizadas por el método ITRAQ8). *Arf2*- ADP-Ribosylation Factor 2; *Cfl2*- cofilin-2; *Tmed*- transmembrane emp24 domain-containing protein 2; *Pop1*- ribonucleases P/MRP protein subunit POP1;(genes codificantes de PDEs visualizadas por el método SDS-PAGE y/O SHOTGUN.- Pop1 y Tmed son exclusivas del GASH/Sal) *Gstp1*- glutación *S-transferasa P 1*;(gen codificante de la PDE visualizada por el método electroforesis 2D).

5. DISCUSIÓN

En los últimos años, la proteómica ha ganado centralidad en los estudios ómicos para aplicaciones básicas y traslacionales, especialmente con fines de diagnóstico y para la medicina dirigida y/o personalizada (Duarte y Spencer, 2016; Chandler et al., 2016). Los enfoques de proteómica diferencial están atrayendo una atención particular debido a la posibilidad de comparar los perfiles de expresión de proteínas en múltiples condiciones biológicas, por ejemplo, tipo salvaje vs mutante o vs tratado farmacológicamente, etc. (Cao et al., 2019; Langfelder et al., 2016).

En esta tesis doctoral, se han desarrollado diferentes metodologías para llevar a cabo el análisis cualitativo-cuantitativo del contenido de proteínas en muestras del núcleo epileptógeno del modelo GASH/Sal y de hámsteres sirios controles, utilizando enfoques tanto de métodos de perfiles de proteómica etiquetados como sin etiquetas, incluyendo además técnicas clásicas como electroforesis bidimensional.

Los métodos basados en el etiquetado emplearon reactivos fluorescentes, como la electroforesis en gel diferencial (DIGE) (Timms y Cramer, 2008; Caterino et al., 2015) o isotópicos, como la técnica iTRAQ de etiqueta isobárica para la cuantificación relativa y absoluta (Evans et al., 2012), usada para etiquetar de manera diferente los dos o más proteomas bajo investigación, junto con enfoques clásicos como la electroforesis bidimensional. Estas estrategias proporcionan mayores niveles de reproducibilidad porque se basan en la separación electroforética contemporánea y/o el análisis de espectrometría de masas en tándem (MS/MS) de las muestras (Zhang y Elias, 2017).

El trabajo ha permitido evaluar los puntos fuertes y débiles de las técnicas empleadas actualmente en este tipo de análisis proteómicos. Los resultados obtenidos mediante las distintas técnicas experimentales en este estudio nos muestran que verdaderamente existe una diferencia proteica relevante en el colículo inferior del modelo GASH/Sal, lo que podría relacionarse con el fenotipo epiléptico presente en estos animales.

5.1. Discusión metodológica

La electroforesis bidimensional puede considerarse como un criterio de pureza positivo debido a su gran poder de resolución, aceptándose que la aparición de una sola mancha indica una muestra homogénea. Se seleccionó este método debido a su alta sensibilidad, posible cuantificación, posibilidad de compatibilizar con espectrometría de masas y a su baja toxicidad y precio.

Una gran limitación que ha condicionado la obtención de resultados fue la cantidad de muestra disponible a analizar, ya que en las distintas etapas del proceso experimental (preparación de la muestra, electroforesis 2D, extracción de las manchas proteicas seleccionadas...) se pierde gran cantidad de muestra.

La electroforesis bidimensional diferencial 2-D DIGE, proporciona una cuantificación precisa y un análisis estadístico de los cambios en la expresión de proteínas, una alta sensibilidad, reducción de la variación gel a gel y alta confianza por la facilidad de tinción entre geles (Marouga et al., 2005). Además, se requieren pocos geles por experimento. Sin embargo, en nuestro caso, en el proceso de resuspensión final previo al marcaje se observó un precipitado cristalino insoluble y viscoso. Esto se reflejó en una cantidad insuficiente de proteína para el marcaje tras la limpieza. Aunque las muestras resultaron marcadas, fue esperable que una limpieza adicional repercutiera en una disminución de la cantidad de muestra y por consiguiente en los resultados.

SDS-PAGE es una técnica que permite separar las proteínas de acuerdo con su movilidad electroforética y, posteriormente, realizar espectrometría de masas en tándem, ofreciendo buenos resultados, parecidos a los obtenidos con la técnica Shotgun. En este caso, la separación no es por geles, sino por cromatografía líquida de alto rendimiento, que combinada con espectrometría de masas, da muy buenos resultados. Sin embargo, presenta la limitación de utilizar inicialmente una mezcla de muestras, no existiendo replicas biológicas, y por tanto no permitiendo realizar un análisis estadístico para estimar el valor de corte de los cambios significativos. Dado que en muchos estudios para que un cambio sea significativo tiene que ser el doble o por encima de 2, este es el valor de ratio que se indica como referencia de corte para el aumento de proteína en el grupo control frente al GASH/Sal, y de 0.5 para la disminución de proteína en el grupo control frente al GASH/Sal. Los resultados comparativos no permiten hacer análisis tipo Volcano plot, ya que no tenemos el dato del logaritmo de la tasa de cambio (del inglés “fold change”, FC).

En general, los métodos de separación y detección de proteínas (como son los empleados en esta tesis doctoral) tienen una sensibilidad menor que la detección de RNA debido a la falta de métodos de amplificación, como ocurre en la técnica de PCR (del inglés “polymerase chain reaction”). Actualmente, los métodos analíticos de proteínas permiten la detección de los cambios de concentración del 10% de todo el proteoma (alrededor de 2000-3000 proteínas de las 3000 diferentes en una célula) (Marouga y cols., 2005). De ahí que los estudios revelen un número relativamente pequeño de proteínas alteradas.

5.2. Discusión de resultados

Las crisis convulsivas audiógenas que sufre el hámster GASH/Sal se inician de forma muy rápidas ante la estimulación con un ruido de alta intensidad (Muñoz et al., 2017), por lo que deben existir diferencias moleculares de base en el núcleo epileptógeno subyacentes a la susceptibilidad y generación de las crisis. Los resultados del presente trabajo están en línea con dicha hipótesis. La diferencia proteica obtenida en la línea GASH/Sal con respecto al control está asociada con distintos procesos celulares como se ha descrito en resultados. La literatura establece que la

asociación de proteínas con epilepsia está principalmente relacionada con los hidratos de carbono, el metabolismo energético, así como con cambios en el citoesqueleto celular (Li et al., 2010; Györfy et al., 2014; Bosque et al., 2019) y en los procesos metabólicos en los que están implicadas varias de las proteínas diferencialmente expresadas que han sido descritas en este trabajo. Un primer análisis nos muestra que las proteínas diferencialmente expresadas que se encuentran en menor concentración en el CI del GASH/Sal, están implicadas en un mayor número de componentes celulares, funciones y procesos biológicos que las proteínas que se encuentran en una mayor concentración. Es decir, están afectando a un mayor número de componentes estructurales y funciones celulares.

Una de las proteínas sobreexpresadas en el CI del modelo GASH/Sal es la alfa-internexina (**INA**) que participa en la regulación de la sinaptogénesis, contribuyendo la formación de neuritas en desarrollo y en la arborización de las estructuras dendríticas (Benson et al., 1996). Otra de las proteínas expresada en mayor cantidad en el GASH/Sal comparado con animales controles, cuyos resultados fueron confirmados mediante análisis de expresión génica RT-qPCR, es la glutatión S-transferasa P 1 (**GSTP1**). La GSTP1 pertenece a una familia de enzimas detoxificantes que intervienen en la reducción metabólica de carcinógenos electrofílicos, protegiendo las macromoléculas biológicas (como las proteínas y los ácidos nucleicos) de las consecuencias tóxicas de una reacción covalente. Estas enzimas han sido implicadas en la detoxificación y biotransformación de muchos xenobióticos, incluidos varios carcinógenos y un número considerable de medicamentos (Díaz et al., 2004).

Algunos estudios han abordado el aumento de expresión de GST y su resistencia a medicamentos, (Wang y Tew, 1985). La GSTP también está implicada en las vías quinasa actuando como regulador negativo (Györfy et al., 2014). La importancia de la GST en la regulación de la quinasa y el papel de la GSTP en la reacción directa de S-glutathionilación ha proporcionado un nuevo enfoque en la comprensión de las alteraciones de los patrones de expresión de la GSTP. En este sentido, algunos tumores o células resistentes a los fármacos pueden depender de esta proteína. Debido a la naturaleza proliferativa de las células tumorales, las vías de las quinasas con frecuencia están reguladas de manera aberrante y, en consecuencia, podrían ser un intento homeostático de compensación, potenciando la expresión de la GSTP para contrarrestar el aumento de actividad de la quinasa.

En humanos, se ha demostrado por análisis de proteómica que la GSTP se detecta de forma exclusiva en el hipocampo de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal cuando se compara con el perfil de proteínas del hipocampo de personas sanas. Estos altos niveles de GSTP en las células endoteliales, gliales y astrocitos se correlacionan con la resistencia a fármacos antiepilépticos (Perkise et al., 2012). De forma similar, nuestros resultados indican que el CI del GASH/Sal

presenta mayor cantidad de GSTP que el CI del hamster control, sugiriendo que puede estar implicado en el inicio o desarrollo de las crisis a través de daños en las rutas metabólicas y oxidativas donde participa la GTPS, tal y como sucede en el humano (Persike et al., 2012).

Es interesante destacar la proteína mitocondrial codificada por el gen *ATAD1* (ATPase Family AAA Domain Containing 1), cuya sobreexpresión en el CI del GASH/Sal fue detectada tanto con el método de detección y cuantificación SHOTGUN como con el método SDS-PAGE. Esta proteína está relacionada con el proceso metabólico de la citrulina, y se asocia con diferentes patologías humanas, como la enfermedad de Unverricht-Lundborg (Orsini et al., 2019), un trastorno poco frecuente de epilepsia mioclónica progresiva tipo 1 y malformaciones corticales tipo Cobblestone (Leshchinskiy et al., 2018).

Otras proteínas sobreexpresadas mitocondriales son las codificadas por los genes *NDUFA4*, *NDUFA5* y *NDUFS8*, que forman parte del complejo I (NADH deshidrogenasa) de la cadena respiratoria mitocondrial implicado en la transferencia de electrones en la respiración aeróbica (síntesis de ATP). Dicho complejo se localiza en la membrana mitocondrial interna.

Cabe resaltar que entre las enfermedades asociadas al gen *FARSA* (identificado por los métodos de iTRAQ y SHOTGUN) se encuentra la deficiencia combinada de la fosforilación oxidativa tipo 4, un desorden caracterizado por presentar distrés mitocondrial. Por otro lado, en la base de datos de enfermedades OMIM, se describe que los genes codificantes de las proteínas identificados por iTRAQ, el gen *VARSI* está relacionado con el desorden del neurodesarrollo con microcefalia, convulsiones y atrofia cortical, y el gen *AARS1* con la encefalopatía epiléptica y del desarrollo.

Otras proteínas sobreexpresadas (identificados por iTRAQ) se relacionan con los genes *MPST* y *AHCY*, implicados en procesos de trans-sulfuración. Dichos genes están relacionados respectivamente con las patologías hipermetioninemia (que puede provocar retraso mental y motor), y disulfiduria mercaptolactato-cisteína (que pueden desembocar en retraso mental). Destacan las ligadas al transporte activo de sodio y potasio gracias a la hidrólisis de ATP. Estas proteínas están codificadas por los *ATP1A1*, *ATP1B1* y *ATP4A*. El transporte activo a través de la membrana axonal es imprescindible para mantener la homeostasis iónica en el interior de la célula. Asimismo, se ha descrito que mutaciones en estos genes generan hiperexcitabilidad neuronal severa (Biondo et al., 2021).

El análisis de expresión de los genes *Lamb2*, *Vamp3*, *Clic4* y *Pgm2l1* indica una coherencia en relación a las proteínas codificadas por los mismos encontradas en el análisis diferencial, porque tanto en los datos obtenidos a partir de los análisis de proteómica como en los resultados obtenidos de las qPCR, se correlaciona que los dos primeros muestran una sobreexpresión en los GASH/Sal, respecto a los controles, y que los dos últimos muestran una menor expresión en los GASH/Sal, respecto a los controles. Hay una incoherencia en el resto de los genes estudiados mediante RT-

qPCR, ya que los que presentan menor expresión en los GASH/Sal con respecto a los controles muestran una mayor abundancia en las proteínas que codifican en los análisis de proteómica (*Ngb*, *Abhd12*, *Ttll5*, *Atxn10*, *Mtfr1l*, *Slc27a4*). Igualmente, proteínas que se encuentran infraexpresadas en los análisis de proteómica, muestran mayor expresión por RT-qPCR en los genes que las codifican en los GASH/Sal con respecto a los controles.

Acerca de la importancia de los genes mencionados con anterioridad, *Ngb* es un gen que codifica para una proteína globular implicada en el transporte de oxígeno en el cerebro, tanto en el sistema nervioso central, como el periférico (Burmester et al., 2000; Reuss et al., 2002) donde puede estar involucrada en el aumento de la disponibilidad de oxígeno y puede proporcionar protección en condiciones de hipoxia o estrés oxidativo (Sun et al., 2003; Mammen et al., 2002). En los estudios de Sun et al., 2003, se ha visto que la expresión de la neuroglobina ha sido aumentada por hipoxia neuronal *in vitro* y por isquemia cerebral *in vivo*. Esta proteína presenta una unión competitiva al oxígeno y contiene residuos que se unen al átomo de hierro. Si bien es cierto que no es capaz de penetrar las membranas celulares, la forma desoxigenada exhibe actividad nitrito reductasa, que inhibe la respiración celular a través de la unión del óxido nítrico a la citocromo c-oxidasa. Además, puede ejercer su actividad anti-apoptótica, actuando para restablecer el nivel desencadenante de liberación de citocromo c mitocondrial, necesario para cometer las células a la apoptosis. ("NGB - Neuroglobin - Homo sapiens (Human) - NGB gene & protein", 2010). Con respecto a la relación que pueda presentar con la epilepsia, se ha visto que después de la isquemia regenera únicamente fases reactivas de la elongación y de la terminación de la síntesis, conduciendo a la disociación de polirribosomas y a la inhibición de síntesis proteica (Hossmann et al., 1992); además, se ha observado un aumento significativo de neuroglobina en el cerebelo de crías cuyas madres fueron sometidas a crisis epilépticas, lo cual puede significar que probablemente ocurra la activación de un programa genético que conduce a la expresión de proteínas específicas que participan en la supervivencia celular y que evitan el retraso de la muerte neuronal (Lima et al., 2011). Cabe destacar, que se han encontrado, además, astrocitos positivos a *Ngb* dentro de las regiones asociadas al desarrollo de la cicatriz astrogial (DellaValle et al., 2010). La proteína que codifica, aparece infraexpresada en nuestras muestras en condiciones basales, lo que le podría dar una desventaja a la hora de responder a los fenómenos de hipoxia asociada a las crisis convulsivas.

Abhd12 es un gen que codifica para una enzima que cataliza la hidrólisis de 2-aracidonoyl glicerol (2-AG), es decir, el principal transmisor lipídico endocannabinoide que actúa sobre los receptores cannabinoides CB1 y CB2 (Blankman et al., 2007). El sistema endocannabinoide está involucrado en una amplia gama de procesos fisiológicos, incluyendo neurotransmisión, estado de ánimo, apetito, apreciación del dolor, comportamiento de adicción, e inflamación (van Hell et al., 2011). Las mutaciones en este gen se asocian con la enfermedad neurodegenerativa, *PHARC*

(polineuropatía, pérdida de audición, ataxia, retinitis pigmentosa y cataratas), resultante de un error innato del metabolismo endocannabinoide (Fiskerstrand et al., 2010). También, se han observado variantes de transcripción de la enfermedad codificadas por mutaciones de esta proteína (Yoshimura et al., 2015). Nishiguchi y colaboradores (2014) estudiaron casos de pacientes que presentaban PHARC junto a epilepsia. La proteína que codifica, aparece sobreexpresada en nuestras muestras en condiciones basales, y puede estar relacionado con el control de la neurotransmisión y la hiperactivación neuronal frente al estímulo, e incluso puede contribuir a la explicación de la sensibilidad a crisis alterada, en el modelo GASH/Sal, ya que el sistema endocannabinoide contribuye directamente al control de la excitación neuronal.

TTLL5 se expresa en el corazón, el músculo esquelético (He & Simons, 2006) y en otros tejidos, como el ojo y el cerebro (Bosch-Grau et al., 2012). Mutaciones en el gen *TTLL5* afectan la función correcta de los flagelos de los espermatozoides (Lee et al., 2013). La proteína interactúa con dos coactivadores de receptores glucocorticoides, que son el factor intermedio transcripcional 2 y el coactivador del receptor de esteroides 1. Esta proteína puede funcionar como un corregulador del receptor glucocorticoide mediado por inducción y represión genética. También puede actuar como una alfa tubulina poliglutamilasa ("*TTLL5* tubulin tyrosine ligase like 5 [*Homo sapiens* (human)] - Gene - NCBI", 2013) Se encuentra más implicada en el paso de inicio de cadena lateral de la reacción de poliglutamilación, que en el paso de alargamiento. La proteína que codifica, aparece sobreexpresada en nuestras muestras en condiciones basales, este cambio puede alterar la red de microtúbulos y consecuentemente el citoesqueleto y distribución de componentes celulares y posiciones de transporte como vesículas y receptores que necesitan ser anclados o transportados a la membrana, especialmente ante un proceso de hiperexcitabilidad como el que sucede en las crisis audiógenas del modelo GASH/Sal.

Atxn10 codifica una proteína que puede intervenir en la supervivencia de las neuronas cerebelosas, la diferenciación de neuronas y la neuritogénesis. Estos roles pueden llevarse a cabo mediante la activación de la vía de la quinasa Ras-MAP activada por mitógenos. Además, puede desempeñar un papel en el mantenimiento de glicosilación intracelular y homeostasis. ("*ATXN10* - Ataxin-10 - *Homo sapiens* (Human) - *ATXN10* gene & protein", 2010). Mutaciones en el gen que codifica esta proteína pueden influir en la aparición de la ataxia espinocerebelosa de tipo 10 (SCA10) (Matsuura et al., 2000). Estudios de Lin & Ashizawa, 2005, describen que todos los pacientes con SCA10 presentaban ataxia cerebelosa, y algunos, además, tenían convulsiones epilépticas.

La proteína que codifica, aparece sobreexpresada en nuestras muestras en condiciones basales y tiene un papel fundamental en la supervivencia neuronal, la diferenciación neuronal y la neuritogénesis. Las diferencias encontradas pueden ayudar a explicar los cambios en la fisiología y

la formación neuronal durante el desarrollo, que se reflejan en cambios duraderos durante la edad adulta, como puede suceder con la susceptibilidad a sufrir crisis audiogénicas del modelo GASH/Sal.

SLC27a4 codifica a un miembro de una familia de proteínas de transporte de ácidos grasos, que participan en la translocación de ácidos grasos de cadena larga que cruzan la membrana plasmática (Yen et al., 2018). Esta proteína se expresa a altos niveles en el lado apical de enterocitos maduros en el intestino delgado y parece ser el principal transportador de ácidos grasos en enterocitos. Estudios clínicos sugieren este gen como un gen candidato para el síndrome de resistencia a la insulina ("SLC27A4 solute carrier family 27 member 4 [*Homo sapiens* (human)] - Gene - NCBI", 2015). Las mutaciones en este gen se han asociado con el síndrome de prematuridad de la ictiosis (Klar et al., 2009). Juega un papel en la formación de la barrera epidérmica ya que es una proteína necesaria para la absorción de grasa en la embriogénesis temprana, y probablemente se encuentra involucrada en el transporte de ácidos grasos a través de la barrera arterial. Además, previene la degeneración inducida por la luz de bastones y conos ("SLC27A4 - Long-chain fatty acid transport protein 4 - Homo sapiens (Human) - SLC27A4 gene & protein", 2012). La proteína que codifica, aparece infraexpresada en nuestras muestras en condiciones basales. Dado que esta es una proteína involucrada en la translocación de ácidos grasos de cadena larga a través de la membrana plasmática, las modificaciones en su expresión pueden afectar la composición de las membranas celulares, y también se ha relacionado con modificaciones en las vías de transporte de glucosa y otros azúcares, así como resistencia a la insulina, ya reportada como alterada en el cerebro de algunos modelos de epilepsia.

En cuanto al gen **Vamp3**, que codifica a proteína de membrana asociada a vesículas, no ha sido muy estudiada, aunque sí se ha visto que una proteína cercana a esta, la codificada por **Vamp2**, tiene cierta implicación en epilepsia (Simmons et al., 2020). Tanto el gen como la proteína aparecen sobreexpresados en el CI del GASH/Sal en condiciones basales. Al ser esta una proteína asociada a los sinaptosomas (componentes principales de un complejo proteico involucrado en el acoplamiento y/o fusión de las vesículas sinápticas con la membrana presináptica), estos cambios pueden explicar muchos de los procesos relacionados con la neurotransmisión alterada y la susceptibilidad a las crisis audiogénicas en el modelo GASH/Sal.

Clic4 codifica el canal intracelular de cloruro 4, proteína presentada en un compartimento vesicular. Los canales de cloruro son un grupo de proteínas que regulan los procesos celulares, incluida la estabilización de la célula potencial de membrana, el transporte transepitelial, el mantenimiento del pH intracelular y la regulación del volumen celular. Puede actuar como un canal aniónico, como un regulador o una subunidad accesoria de otras proteínas que podrían proporcionar la función de formación de poros (Mobasheri et al., 2000), aunque se sugiere que puede no ser

responsable de convulsiones infantiles familiares benignas (Li et al., 2010). La proteína que codifica, aparece infraexpresada en nuestras muestras en condiciones basales. Esta proteína incide directamente en la estabilización del potencial de membrana celular, evento que ciertamente afecta la respuesta eléctrica de las membranas neuronales, y a los umbrales de excitación neuronal y, consecuentemente, a la hiperexcitabilidad, proceso esencial en el CI, región del foco epiléptico en GASH/Sal.

Del resto de proteínas analizadas no se ha encontrado en la literatura demasiada información acerca de su relación directa con procesos epilépticos, lo cual puede significar que no tenga relación o que todavía no se conozca lo suficiente o no se haya realizado la experimentación necesaria. Finalmente, los resultados de esta tesis doctoral apuntan que los siguientes experimentos a realizar en futuras líneas de investigación, deben incluir la comprobación de los resultados mediante la técnica de Western Blot con el fin de observar si las proteínas que resultaron sobreexpresadas en el CI del modelo GASH/Sal y el RNA infraexpresado en los análisis de RT-qPCR, pudieran presentar una baja tasa de recambio, lo que explicaría las discordancias encontradas en el presente estudio.

6. CONCLUSIONES

Primera: Existen diferencias proteicas de base en el colículo inferior del modelo GASH/Sal en relación con los animales controles.

Segunda: El colículo inferior del modelo GASH/Sal sobreexpresa proteínas que participan en el control de la neurotransmisión y la hiperactivación neuronal frente al estímulo, lo que pudiera explicar la susceptibilidad GASH/Sal a desencadenar crisis convulsivas.

Tercera: Muchas de las proteínas diferencialmente expresadas están relacionadas con el metabolismo de los hidratos de carbono y el metabolismo energético. El transporte activo a través de la membrana axonal es imprescindible para mantener la homeostasis iónica en el interior de la célula, por lo que cambios en los niveles de proteínas que sintetizan ATP pueden alterar esa homeostasis.

Cuarta: Varias proteínas del citoesqueleto aparece sobreexpresadas en condiciones basales en el núcleo epileptógeno del modelo GASH/Sal. Estos cambios pueden alterar la red de microtúbulos y el transporte de vesículas y receptores que necesitan ser anclados o transportados a la membrana, especialmente ante un proceso de hiperexcitabilidad, como el que sucede en las crisis audiógenas del GASH/Sal.

Quinta: Se han encontrado niveles alterados de proteínas implicadas en el transporte de oxígeno en el cerebro del modelo GASH/Sal, lo que pudiera afectar a la disponibilidad de oxígeno en el tejido epileptógeno, y, por tanto, a la protección en condiciones de hipoxia o estrés oxidativo.

Sexta: Existe una mayor cantidad de la proteína glutatión reductasa en el colículo inferior del modelo GASH/Sal, proteína implicada en múltiples cascadas regulatorias celulares. Este incremento puede ser relevante, ya que puede estar involucrado en el inicio o desarrollo de las crisis a través de daños en las rutas metabólicas y oxidativas, tal y como sucede en las epilepsias humanas.

Séptima: Varias de las proteínas diferencialmente expresadas en el núcleo epileptógeno del GASH/Sal están codificadas por genes en los que se han descrito mutaciones asociadas a procesos convulsivos y a encefalopatía epiléptica.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Avanzini G, Manganotti P, Meletti S, Moshé SL, Panzica F, Wolf P, Capovilla G. The system epilepsies: a pathophysiological hypothesis. *Epilepsia* 2012; 53(5):771-778

- Barrera-Bailón B, Oliveira J, López D, Muñoz L, Garcia-Cairasco N, Sancho C. Pharmacological and neuroethological studies of three antiepileptic drugs in the Genetic Audiogenic Seizure Hamster (GASH:Sal). *Epilepsy & Behavior* 2013;28(3):413-425. doi: 10.1016/j.yebeh.2013.05.028

- Barrera-Bailón B, Oliveira J, López D, Muñoz L, Garcia-Cairasco N, Sancho C. Pharmacological and neuroethological study of the acute and chronic effects of lamotrigine in the genetic audiogenic seizure hamster (GASH:Sal). *Epilepsy & Behavior* 2017;71: 207-217. doi: 10.1016/j.yebeh.2015.11.005

- Barrios LF. El receptor tipo opioide ORL1 en los GASH/Sal, una nueva línea de Hámsters Sirios con epilepsia audiógena (Tesis doctoral). Univ. de Salamanca; 2008. <http://hdl.handle.net/10366/55967> ´

- Benson DL, Mandell JW, Shaw G, Banker G. Compartmentation of alpha-internexin and neurofilament triplet proteins in cultured hippocampal neurons. *Journal of neurocytology* 1996;25(1): 181- 196

- Biondo ED, Spontarelli K, Ababioh G, Méndez L, Artigas P. Diseases caused by mutations in the Na⁺/K⁺ pump $\alpha 1$ gene ATP1A1. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2021; 321(2):C394-C408. doi: 10.1152/ajpcell.00059.2021.

- Blankman J, Simon G, Cravatt B. A Comprehensive Profile of Brain Enzymes that Hydrolyze the Endocannabinoid 2-Arachidonoylglycerol. *Chemistry & Biology* 2007;14(12):1347-1356. doi: 10.1016/j.chembiol.2007.11.006

- Bosch-Grau, M, Rochas C, Meunier A, Spassky N, Janke C. Tubulin posttranslational modifications as regulators of microtubule-based functions in cells. *Cilia* 2012; 1(S1). doi: 10.1186/2046-2530-1-s1-p17

- Bosque J, Gómez-Nieto R, Hormigo S, Herrero-Turrión M, Díaz-Casado E, Sancho C, López DE. Molecular tools for the characterization of seizure susceptibility in genetic rodent models of epilepsy. *Epilepsy & Behavior* 2021; 121(Pt B):106594. doi: 10.1016/j.yebeh.2019.106594

- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 1976;72(1): 248-254

- Browning R. Neuroanatomical localization of structures responsible for seizures in the GEPR: Lesion studies. *Life Sciences* 1986;39(10):857-867. doi: 10.1016/0024-3205(86)90367-x

- Burmester T, Weich B, Reinhardt S, Hankeln T. A vertebrate globin expressed in the brain. *Nature* 2000;407(6803):520-523. doi: 10.1038/35035093

- Cao Y, Li Z, Mao L, Cao H, Kong J, Yu B, et al. The use of proteomic technologies to study molecular mechanisms of multidrug resistance in cancer. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2019 Jan 15;162:423–434. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.10.001>

- Carballosa-González M. Hacia un nuevo modelo de epilepsia: el hámster GASH/Sal. (Tesis doctoral). Univ. de Salamanca; 2008. <http://hdl.handle.net/10366/55970>

- Carballosa-Gonzalez M, Muñoz LJ, Sancho C, López-Alburquerque T, Pardal-Fernández MJ, Nava E, et al. EEG characterization of audiogenic seizures in the hamster strain GASH:Sal. *Epilepsy Res.* 2013;106:318–25. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2013.07.001

- Carmona-Saez P, Chagoyen M, Tirado F, Carazo JM, Pascual-Montano A. Genecodis: a web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists. *Genome Biol.* 2007; 8: R3

- Caterino M, Pastore A, Strozzi MG, Di Giovamberardino G, Imperlini E, Scolamiero E, et al. The proteome of cblC defect: in vivo elucidation of altered cellular pathways in humans. *J Inherit Metab Dis.* 2015 Sep;38(5):969–79. <https://doi.org/10.1007/s10545-014-9806-4>

- Chandler RJ, Sloan JL, Dorko K, Cusmano-Ozog K, Ingenito L, et al. The proteome of methylmalonic acidemia (MMA): the elucidation of altered pathways in patient livers. *Molecular Biosystems* 2016 Feb;12(2):566–74. <https://doi.org/10.1039/c5mb00736d> PMID: 26672496

- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of ARN isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156-9

- Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol.* 2008;26 pp: 1367-72

- Cox J, Neuhauser N, Michalski A, Scheltema RA, Olsen JV, Mann M. Andromeda: A Peptide Search Engine Integrated into the MaxQuant Environment. *J Proteome Res.* 2011;10:1794–1805
- De Cabo de la Vega C, Villanueva-Hernández P, Prieto-Martín A. Neuroquímica de la epilepsia, neurotransmisión inhibitoria y modelos experimentales: nuevas perspectivas. *Rev Neurol.* 2006; 42(3): 159-168
- DellaValle B, Hempel C, Kurtzhals J, Penkowa M. In vivo expression of neuroglobin in reactive astrocytes during neuropathology in murine models of traumatic brain injury, cerebral malaria, and autoimmune encephalitis. *Glia* 2010;58(10):1220-1227. doi: 10.1002/glia.21002
- Díaz C, Rodríguez MM, Fresneda M, Bisset JA. Determinación de la actividad glutatión-S-transferasa en cepas de *Culex quinquefasciatus* de Cuba y otros países de América Latina. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 2004;56(2): 111-116
- Díaz-Casado E, Gómez-Nieto R, de Pereda J, Muñoz L, Jara-Acevedo M, López D. Analysis of gene variants in the GASH/Sal model of epilepsy. *PLOS ONE* 2020;15(3): e0229953. doi: 10.1371/Journal.pone.0229953
- Díaz-Rodríguez S, López-López D, Herrero-Turrión M, Gómez-Nieto R, Canal-Alonso A, López, D. Inferior Colliculus Transcriptome After Status Epilepticus in the Genetically Audiogenic Seizure-Prone Hamster GASH/Sal. *Frontiers In Neuroscience* 2020; 14. doi: 10.3389/fnins.2020.00508
- Duarte TT, Spencer CT. Personalized proteomics: the future of precision medicine. *Proteomes* 2016; 4(4):29. <https://doi.org/10.3390/proteomes4040029> PMID: 27882306
- Engel J Jr. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: Report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia* 2001; 42: 1-8.
- Evans C, Noirel J, Ow SY, Salim M, Pereira-Medrano AG, Couto N, et al. An insight into iTRAQ: where do we stand now? *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2012; 404,1011:1027. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5918-6>
- Faingold CL. Emergent properties of CNS neuronal networks as targets for pharmacology: application to anticonvulsant drug action. *Prog Neurobiol.* 2004; 72(1):55-85.

- Fisher R, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross J, Elger C, et al. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 2014; 55(4): 475-482. doi: 10.1111/epi.12550
- Fisher R, Cross J, French J, Higurashi N, Hirsch E, Jansen F, et al. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia* 2017; 58(4): 522-530. doi: 10.1111/epi.13670
- Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel J Jr. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* 2005; 46(4):470-472.
- Fiskerstrand T, H'mida-Ben Brahim D, Johansson S, M'zahem A, Haukanes B, Drouot N, et al. Mutations in ABHD12 Cause the Neurodegenerative Disease PHARC: An Inborn Error of Endocannabinoid Metabolism. *The American Journal Of Human Genetics* 2010;87(3): 410-417. doi: 10.1016/j.ajhg.2010.08.002
- García-Cairasco N. A critical review on the participation of inferior colliculus in acoustic-motor and acoustic-limbic networks involved in the expression of acute and kindled audiogenic seizures. *Hearing Res.* 2002; 168: 208-222.
- García-Cairasco N, Umeoka E, Cortes de Oliveira J. The Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain and its contributions to epileptology and related comorbidities: History and perspectives. *Epilepsy & Behavior* 2017;71: 250-273. doi: 10.1016/j.yebeh.2017.04.001
- Györffy B, Kovács Z, Gulyácssy P, Simor A, Völgyi K, Orbán G. et al. Brain protein expression changes in WAG/Rij rats, a genetic rat model of absence epilepsy after peripheral lipopolysaccharide treatment. *Brain, Behavior and Immunity* 2014;(35):86–95
- Havlis J, Thomas H, Sebela M, Shevchenko A. Fast-response proteomics by accelerated in-gel digestion of proteins. *Anal Chem.* 2003;75: 1300–6
- He Y, Simons S. STAMP, a Novel Predicted Factor Assisting TIF2 Actions in Glucocorticoid Receptor-Mediated Induction and Repression. *Molecular And Cellular Biology* 2006; 27(4): 1467-1485. doi: 10.1128/mcb.01360-06
- Heukeshoven J, Dernick R. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* 1985; 6(3): 103-112

- Hossmann KA, Widmann R, Wiessner C, Dux E, Djuricic B, Röhn G. Protein synthesis after global cerebral ischemia and selective vulnerability. In: Krieglstein, J., Oberpichler-Schwenk, H. (Eds.), *Pharmacology of Cerebral Ischemia* 1992. Medpharm. Scientific Publishers, Stuttgart, pp. 289–299
- Huss VA, Volker AR, Festl, Herbert, Schleifer, Karl Heinz. Studies on the spectrophotometric determination of ADN hybridization from renaturation rates. *Systematic and Applied Microbiology* 1983;4(2):184-192
- Huxtable R, Laird H. The prolonged anticonvulsant action of taurine on genetically determined seizure-susceptibility. *The Canadian journal of neurological sciences* 1978; 5(2): 215-221
- Käll L, Canterbury J, Weston J, Noble WS, MacCoss MJ. A semi-supervised machine learning technique for peptide identification from Shotgun proteomics datasets. *Nature Methods* 2007;4:923–25
- KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. (2001). Retrieved 8 June 2021. Available from <https://www.genome.jp/kegg/>
- Kesner R. Subcortical mechanisms of audiogenic seizures. *Experimental Neurology* 1966;15(2):192-205. doi: 10.1016/0014-4886(66)90045-8
- Klar J, Schweiger M, Zimmerma, R, Zechner R, Li H, Törmä H, et al. Mutations in the Fatty Acid Transport Protein 4 Gene Cause the Ichthyosis Prematurity Syndrome. *The American Journal Of Human Genetics* 2009; 85(2):248-253. doi:10.1016/j.ajhg.2009.06.021
- Komsuoglu-Celikyurt I, Isık E, Erdolu C. Audiogenic Seizures and Their Importance in Experimental Behavioral Studies: A Review. *Medical Science Review* 2016; (3): 110-118. doi: 10.12659/msrev.899608
- Langfelder P, Cattle JP, Chatzopoulou D, Wang N, Gao FF, Al-Ramahi I, et al. Integrated genomics and proteomics define huntingtin CAG length-dependent networks in mice. *Nature Neuroscience* 2016; 19(4):623–33. <https://doi.org/10.1038/nn.4256>
- Lee G, He Y, Dougherty E, Jimenez-Movilla M, Avella M, Grullon S, et al. Disruption of Ttl15/Stamp Gene (Tubulin Tyrosine Ligase-like Protein 5/SRC-1 and TIF2-associated Modulatory Protein Gene) in Male Mice Causes Sperm Malformation and Infertility. *Journal of Biological Chemistry* 2013; 288(21):15167-15180. doi: 10.1074/jbc.m113.45393

- Leshchinskiy S, Ali N, D'Agostino R. Cobblestone sign. *Abdom Radiol (NY)*. 2018; 43(12):3532-3533. doi: 10.1007/s00261-018-1661-6.
- Lima D, Cossa A, Perosa S, Oliveira E, Silva J, Silva Fernandes M, et al. Neuroglobin is up-regulated in the cerebellum of pups exposed to maternal epileptic seizures. *International Journal of Developmental Neuroscience* 2011; 29(8):891-897. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2011.07.002
- Li A, Choi YS, Dziema H, Cao R, Cho HY, Jung YJ, Obrietan K. Proteomic profiling of the epileptic dentate gyrus. *Brain Pathol.* 2010; 20(6):1077-89. doi: 10.1111/j.1750-3639.2010.00414.x.
- Li N, Li H, Jiang H, Shen L, Yan X, Guo J, et al. Mutation Detection in Candidate Genes for Benign Familial Infantile Seizures on a Novel Locus. *International Journal of Neuroscience* 2010;120(3):217-221. doi: 10.3109/00207450903477779
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25(4):402-408
- López-López D, Gómez-Nieto R, Herrero-Turrión M, García-Cairasco N, Sánchez-Benito D, Ludeña M, López D. Overexpression of the immediate-early genes Egr1, Egr2, and Egr3 in two strains of rodents susceptible to audiogenic seizures. *Epilepsy & Behavior* 2017; 71:226-237. doi: 10.1016/j.yebeh.2015.12.020
- Lopez-Serra P, Marcilla M, Villanueva A, Ramos-Fernandez A, Palau A, Leal L, et al. A DERL3-associated defect in the degradation of SLC2A1 mediates the Warburg effect. *Nature Communications* 2014;5(1). doi: 10.1038/ncomms4608
- Löscher W. Animal Models of Seizures and Epilepsy: Past, Present, and Future Role for the Discovery of Antiseizure Drugs. *Neurochemical Research* 2017; 42(7): 1873-1888. doi: 10.1007/s11064-017-2222-z
- Mammen P, Shelton J, Goetsch S, Williams S, Richardson J, Garry M, Garry D. Neuroglobin, A Novel Member of the Globin Family, Is Expressed in Focal Regions of the Brain. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2002; 50(12):1591-1598. doi: 10.1177/002215540205001203

- Marouga R, David SO, Hawkins E. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal Bioanal Chem.* 2005;82(3):669-78. DOI: 10.1007/s00216-005-3126-3

- Matsuura T, Yamagata T, Burgess D, Rasmussen A, Grewal R, Watase K, et al. Large expansion of the ATTCT pentanucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 10. *Nature Genetics* 2000; 26(2): 191-194. doi: 10.1038/79911

- Maxson S, Cowen J. Electroencephalographic correlates of the audiogenic seizure response of inbred mice. *Physiology & Behavior* 1976; 16(5): 623-629. doi: 10.1016/0031-9384(76)90224-9

- McCown TJ, Greenwood RS, Frye GD, Breese GR. Electrically elicited seizures from the inferior colliculus: a potential site for the genesis of epilepsy?. *Experimental neurology* 1984; 86(3): 527-542

- McFarland K, Liu J, Landrian I, Zeng D, Raskin S, Moscovich M, et al. Repeat interruptions in spinocerebellar ataxia type 10 expansions are strongly associated with epileptic seizures. *Neurogenetics* 2013; 15(1):59-64. doi: 10.1007/s10048-013-0385-6

- Mobasheri A, Avila J, Cózar-Castellano I, Brownleader M, Trevan M, Francis M, et al. Na⁺, K⁺-ATPase Isozyme Diversity; Comparative Biochemistry and Physiological Implications of Novel Functional Interactions. *Bioscience Reports* 2000; 20(2):51-91. doi: 10.1023/a:1005580332144

- Muñoz LJ, Carballosa-Gautam MM, Yanowsky K, García-Atarés N, López DE. The genetic audiogenic seizure hamster from Salamanca: The GASH: Sal. *Epilepsy & Behav.* 2017;71: 181-192.

- Nishiguchi K, Avila-Fernandez A, van Huet R, Corton M, Pérez-Carro R, Martín-Garrido E, et al. Exome Sequencing Extends the Phenotypic Spectrum for ABHD12 Mutations. *Ophthalmology* 2014; 121(8):1620-1627. doi: 10.1016/j.opthta.2014.02.00

- Nogales-Cadenas R, Carmona-Saez P, Vazquez M, Vicente C, Yang X, Tirado F, Carazo JM, Pascual-Montano A. GeneCodis: interpreting gene lists through enrichment analysis and integration of diverse biological information. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37: W317-22

- Olsen JV, de Godoy LM, Li G, Macek B, Mortensen P, Pesch R, Makarov A, Lange O, Horning S, Mann M. Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap. *Mol Cell Proteomics* 2005; 4(12):2010-21
- Ono T, Galanopoulou AS. Epilepsy and epileptic syndrome. *Adv Exp Med Biol.* 2012; 724:99-113. doi: 10.1007/978-1-4614-0653-2_8.
- Orsini A, Valetto A, Bertini V, Esposito M, Carli N, Minassian BA, Bonuccelli A, Peroni D, Michelucci R, Striano P. The best evidence for progressive myoclonic epilepsy: A pathway to precision therapy. *Seizure.* 2019; 71:247-257. doi: 10.1016/j.seizure.2019.08.012.
- Perkins, DN, Pappin, DJ, Creasy, DM and Cottrell, JS, Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 1999; 20(18):3551-67
- Persike DS, Lima ML, Amorim RP, Cavaleiro EA, Yacubian EMT, Centeno RS, et al. Hippocampal proteomic profile in temporal lobe epilepsy. *J. epilepsy clin. Neurophysiol* 2012; 18(2):53-56
- Prieto-Martín AI, Llorens S, Pardal-Fernandez JM, Muñoz L, López DE, Escribano J, Nava E, De Cabo C. Opposite caudal versus rostral brain nitric oxide synthase response to generalized seizures in a novel rodent model of reflex epilepsy. *Life Sciences* 2012; 90:531–537
- Qin L, Liu X, Liu S, Liu Y, Yang Y, Yang H, et al. Differentially expressed proteins underlying childhood cortical dysplasia with epilepsy identified by iTRAQ proteomic profiling. *PLOS ONE* 2017;12(2):e0172214. doi: 10.1371/Journal.pone.0172214
- Raisinghani M, Faingold CL. Neurons in the amygdala play an important role in the neuronal network mediating a clonic form of audiogenic seizures both before and after audiogenic kindling. *Brain research* 2005; 1032(1): 131-140
- Ramos-Fernández A, Paradela A, Navajas R, Albar J. Generalized Method for Probability-based Peptide and Protein Identification from Tandem Mass Spectrometry Data and Sequence Database Searching. *Molecular & Cellular Proteomics* 2008; 7(9): 1748-1754. doi: 10.1074/mcp.m800122-mcp200

- Rappsilber J, Mann M, Ishihama Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nature Protocols* 2007; 2(8):1896-906.
- Reuss S, Saaler-Reinhardt S, Weich B, Wystub S, Reuss M, Burmester T, Hankeln T. Expression analysis of neuroglobin mRNA in rodent tissues. *Neuroscience* 2002; 115(3): 645-656. doi: 10.1016/s0306-4522(02)00536-5
- Romcy-Pereira RN, García-Cairasco N. Hippocampal cell proliferation and epileptogenesis after audiogenic kindling are not accompanied by mossy fiber sprouting or fluoro-jade staining. *Neuroscience* 2003; 119: 533-46
- Ross K, Coleman J. Developmental and genetic audiogenic seizure models: behavior and biological substrates. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 2000; 24(6): 639-653. doi: 10.1016/s0149-7634(00)00029-4
- Salas-Puig J, Tuñón A, Vidal JA, Mateos V, Guisasola LM, Lahoz CH. La epilepsia mioclónica juvenil de Janz: un síndrome frecuente poco conocido. Estudio de 85 pacientes. *Medicina clínica* 1994; 103(18): 684-689
- Salas-Puig J, Mateos V, Amorin M, Calleja S, Jimenez L. Reflex epilepsies. *Rev Neurol.* 2000; 30 Suppl 1: S85-9
- Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, et al. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia* 2017; 58(4):512–521
- Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* 2008; 3:1101-1108
- Schwanhäusser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, Chen W, Selbach M. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 2011; 473(7347):337-42. doi: 10.1038/nature10098. Erratum in: *Nature* 2013; 495(7439):126-7
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem.* 1996; 68(5):850-8

- Simmons R, Li H, Alten B, Santos M, Jiang R, Paul B, et al. Overcoming presynaptic effects of VAMP2 mutations with 4-aminopyridine treatment. *Human Mutation* 2020; 41(11):1999-2011. doi: 10.1002/humu.24109

- STRING: functional protein association networks. (2008). Retrieved 10 May 2021. Available from <https://string-db.org/>

- Sun Y, Jin K, Peel A, Mao X, Xie L, Greenberg D. Neuroglobin protects the brain from experimental stroke in vivo. *Proceedings of The National Academy of Sciences* 2003; 100(6): 3497-3500. doi: 10.1073/pnas.0637726100

- Tabas-Madrid D, Nogales-Cadenas R, Pascual-Montano A. GeneCodis3: A nonredundant and modular enrichment analysis tool for functional genomics. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40: 478–483

- Timms JF, Cramer R. Difference gel electrophoresis. *Proteomics* 2008; 8(23-24):4886-97. doi: 10.1002/pmic.200800298.

- UniProt. (2002). Retrieved 10 May 2021. Available from: <https://www.uniprot.org/>

- Van Hell H, Jager G, Bossong M, Brouwer A, Jansma J, Zuurman L, et al. Involvement of the endocannabinoid system in reward processing in the human brain. *Psychopharmacology* 2011; 219(4):981-990. doi: 10.1007/s00213-011-2428-8

- Vasco-Cárdenas MF, Baños S, Ramos A, Martín JF, Barreiro C. Proteome response of *Corynebacterium glutamicum* to high concentration of industrially relevant C4 and C5 dicarboxylic acids. *Journal of proteomics* 2013; 85: 65-88

- Wada J, Terao A, White B, Jung E. Inferior colliculus lesion and audiogenic seizure susceptibility. *Experimental Neurology* 1970; 28(2):326-332. doi: 10.1016/0014-4886(70)90240-2

- Wang AL, Tew KD. Increased glutathione-S-transferase activity in a cell line with acquired resistance to nitrogen mustards. *Cancer treatment reports* 1985; 69(6): 677-682.

- Willott J, Lu S. Midbrain pathways of audiogenic seizures in DBA2 mice. *Experimental Neurology* 1980;70(2): 288-299. doi: 10.1016/0014-4886(80)90028-x

- Yang L, Long C, Faingold CL. Audiogenic seizure susceptibility is induced by termination of continuous infusion of γ -aminobutyric acid or an N-methyl-d-aspartic acid antagonist into the inferior colliculus. *Experimental Neurology* 2001; 171(1): 147-152

- Yen M, Chou S, Kan J, Kuo P, Hou M, Hsu Y. Solute Carrier Family 27 Member 4 (SLC27A4) Enhances Cell Growth, Migration, and Invasion in Breast Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 201; 19(11):3434. doi:10.3390/ijms19113434

- Yoshimura H, Hashimoto T, Murata T, Fukushima K, Sugaya A, Nishio S, Usami S. (). Novel ABHD12 Mutations in PHARC Patients: The Differential Diagnosis of Deaf-Blindness. *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology* 2015; 124(1_suppl):77S-83S. doi: 10.1177/0003489415574513

- Zhang L, Elias JE. Relative Protein Quantification Using Tandem Mass Tag Mass Spectrometry. *Methods in Molecular Biology* 2017; 1550:185–198. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6747-6_14

8- ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

- ACN** : acetonitrilo
- AMG** : amígdala
- CCA** : crisis convulsivas audiógenas
- CDCI** : corteza dorsal del colículo inferior
- CE** : energía de colisión rodante
- CECI** : corteza externa del colículo inferior
- CGM** : cuerpo geniculado medial
- CHAPS** : 3-(cloroamido propil)-dimetilamonio-1-propanosulfato
- CI-** : colículo inferior
- CO₂** : dióxido de carbono
- COS** : complejo olivar superior
- CPCS** : capas profundas del colículo superior
- CT** : ciclo umbral, en inglés *cycle threshold*
- CTD** : base de datos de Toxicogenómica Comparativa, en inglés *Comparative Toxicogenomics Database*
- CTRL** : control
- CUR** : cortina de gas
- Da** : daltons
- línea de ratón. Llamado así por los genes del color de su pelaje. Del inglés dilute
- DBA** : (Myo5ad/Myo5ad), brown (Tyrrp1b/Tyrrp1b) and non-agouti (a/a) recessive mutations.
- dB** : decibelios
- DIGE** : electroforesis diferencial en gel, en inglés *Difference gel electrophoresis*
- DNA** : ácido desoxirribonucleico, en inglés *DeoxyriboNucleic Acid*
- DNAC** : DNA complementario
- DP** : potencial de desagrupamiento
- DTT** : ditioneitol
- EDTA** : ácido etilendiaminotetraacético
- EEG** : electroencefalograma
- FC** : tasa de cambio. del inglés *fold change*
- FDR** : tasa de descubrimientos falsos, del inglés *Fase Discovery Rate*
- FDR** : ratio de falsos positivos, en inglés *false discovery rate*
- FELASA** : federación europea de asociaciones de animales de laboratorio, en inglés *Federation of European Laboratory Animal Science Associations*
- FRP** : formación reticular pontina
- GAPDH** : Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
- GASH/Sal** : *Genetic audiogenic seizure hamster, Salamanca.*
- GO** : anotaciones funcionales, del inglés *Gene Ontology*
- GPG/Vall** : genetically epilepsy-prone hamsters, Valladolid
- GS1** : gas de fuente de iones 1
- HP** : *Human Phenotype Ontology*
- HPA** : *Human Protein Atlas*
- IBAQ** : Cuantificación absoluta basada en la intensidad, del inglés *Intensity Based Absolute Quantification*
- IBE** : buró Internacional para la Epilepsia, en inglés *International Bureau for Epilepsy*
- IDA** : adquisición dependiente de información
- IHT** : calentador de interfaz

- ILAE** : liga internacional contra la epilepsia, del inglés *International League Against Epilepsy*
- INCYL-** : Instituto de Neurociencias de Castilla y León
- ISVF** : voltaje de pulverización de iones flotante
- iTRAQ** : etiquetas isobáricas para cuantificación absoluta y relativa de proteínas, en inglés *Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation*
- KEGG** : *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*
- LC** : cromatografía líquida, del inglés *Liquid Chromatography*
- LFQ** : cuantificación proteica diferencial sin marcaje, en inglés *Labe-free quantification*
- miRNA** : micro RNA
- MMTS** : metanotiosulfonato de metilo
- MS/MS** : espectometría de masas en tándem
- NCCI** : núcleo central del colículo inferior
- NC** : núcleo coclear
- NLL** : núcleo del lemnisco lateral
- PANTHER** : *Protein ANALysis THrough Evolutionary Relationships Classification System*
- PDEs** : proteínas diferen
- PDEs** : cialmente expresadas
- P.I.** : Punto isoeléctrico
- PM** : Peso molecular
- PSIMOD** : ontología de modificación de proteínas, en inglés *Protein Modification Ontology*
- PU** : buffer urea
- RIN** : factor de integridad del RNA, del inglés *RNA integrity number*
- RNA** : ácido ribonucleico, del inglés *RiboNucleic Acid*
- RNAm** : RNA mensajero
- RT-qPCR** : reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real. Del inglés *Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction*
- SDS-PAGE** : electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico, en inglés *Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*.
- SHOTGUN** : Del inglés, proteómica de escopeta . Técnica de identificación masiva de proteínas
- SNC** : sistema nervioso central
- SNR** : porción reticular de la sustancia negra
- SPG** : sustancia gris periacueductal.
- TCA** : ácido tricloroacético, del inglés *Trichloroacetic Acid*
- TCEP** : tris- 2-carboxietil-fosfina
- TEAB** : bicarbonato de trietilamonio
- TF** : TRANSFAC
- TFA** : ácido fórmico

9- ANEXOS

ANEXO 1- Permisos del Comité de Bioética



COMITÉ DE BIOÉTICA (CBE)

Edificio I+D+i
C/ Espejo 2, 37007 Salamanca
Tel. (34) 923 29 44 00 ext 1181
e-mail: cbioetica@usal.es

Informe de Evaluación de Proyectos de Investigación o Docencia (RD 53/013):

Órgano Habilitado: Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca.

Título del Proyecto: Sustrato molecular de las crisis epileptógenas en el modelo GASH:Sal..

Número de Registro: 300

Investigador(a) principal: M^a. Dolores Estilita López García.

Resultado de la Evaluación: Favorable

La información presentada referente al proyecto reseñado cumple los requisitos del RD 53/13 en cuanto a:

- Los objetivos del proyecto se encuentran justificados desde un punto científico o docente, o legal estando justificado el uso de animales vivos.
- Su diseño procedimental respeta los principios de humanidad con los animales y cuidado del medio ambiente
- Se estima que los posibles beneficios científicos o el valor docente del mismo son adecuados
- Los procedimientos experimentales planteados se encuentran diseñados de conformidad con los requisitos de reemplazo, reducción y refinamiento.
- El proyecto está clasificado según su grado de severidad y tipificación contemplada en la ley.
- Se ha realizado un análisis de daño-beneficio, contemplando el posible beneficio obtenido para la salud humana, animal o el medio ambiente, en función de los objetivos propuestos y el número y gravedad de los procedimientos empleados con los animales, habiendo examinado a su vez las situaciones y excepciones que contempla la ley
- No es necesaria la evaluación retrospectiva del proyecto
- Se ha garantizado la inexistencia de conflicto de intereses en los casos que existieran, con respecto al proyecto evaluado tal como se contempla en los estatutos del comité
- Asesoramiento de expertos externos: NO

Salamanca a 04 julio de 2018

Fdo.: Luis Muñoz de la Pascua
Secretario del CBE



Fdo: Jose Julián Calvo Andrés
Presidente del CBE



COMITÉ DE BIOÉTICA (CBE)

Edificio I+D+i
C/ Espejo 2, 37007 Salamanca
Tel. (34) 923 29 44 00 ext 1181
e-mail: cbioetica@usal.es

Informe de Evaluación de Proyectos de Investigación o Docencia (RD 53/013):

Órgano Habilitado: Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca

Título del Proyecto: Búsqueda de nuevos biomarcadores moleculares para detección de la epileptogénesis

Número de Registro: 375

Investigador(a) principal: M^a Dolores López García

Resultado de la Evaluación: Favorable

La información presentada referente al proyecto reseñado cumple los requisitos del RD 53/13 en cuanto a:

- Los objetivos del proyecto se encuentran justificados desde un punto científico o docente, o legal estando justificado el uso de animales vivos.
- Su diseño procedimental respeta los principios de humanidad con los animales y cuidado del medio ambiente
- Se estima que los posibles beneficios científicos o el valor docente del mismo son adecuados
- Los procedimientos experimentales planteados se encuentran diseñados de conformidad con los requisitos de reemplazo, reducción y refinamiento.
- El proyecto está clasificado según su grado de severidad y tipificación contemplada en la ley.
- Se ha realizado un análisis de daño-beneficio, contemplando el posible beneficio obtenido para la salud humana, animal o el medio ambiente, en función de los objetivos propuestos y el número y gravedad de los procedimientos empleados con los animales, habiendo examinado a su vez las situaciones y excepciones que contempla la ley
- No es necesaria la evaluación retrospectiva del proyecto
- Se ha garantizado la inexistencia de conflicto de intereses en los casos que existieran, con respecto al proyecto evaluado tal como se contempla en los estatutos del comité
- Asesoramiento de expertos externos: NO

Salamanca a 22 de marzo de 2019

Fdo.: Luis Muñoz de la Pascua
Secretario del CBE



Fdo: Jose Julián Calvo Andrés
Presidente del CBE

ANEXO 2- Resultados SHOGUN

GEN	PROTEÍNA	Ratio IBAQ
<i>Glg1</i>	Golgi apparatus protein 1 isoform X1	100,00
<i>Anxa6</i>	Annexin A6 isoform X1	100,00
<i>Ndrp2</i>	Protein ndrg2 isoform x2	100,00
<i>Tuba8</i>	Tubulin Alpha 8	100,00
<i>Mbp</i>	Myelin basic protein S isoform X1	100,00
<i>Ppp1ca</i>	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit isoform X1	100,00
<i>Mapre3</i>	Microtubule-associated protein RP/EB family member 3 isoform X1	100,00
<i>Sept5</i>	Septin-5 isoform X2	100,00
<i>Rdx</i>	Radixin	100,00
<i>Hebp1</i>	Heme-binding protein 1	100,00
<i>Ehd4</i>	EH domain-containing protein 4	100,00
<i>Rac3</i>	Ras-related c3 botulinum toxin substrate 3 isoform x1;	100,00
<i>Klc2</i>	Kinesin light chain 2 isoform X1	100,00
<i>Usp9x</i>	Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase faf-x isoform x2	100,00
<i>Afg3l2</i>	AFG3 Like Matrix AAA Peptidase Subunit 2	100,00
<i>Rab6a</i>	RAB6A-GEF complex partner protein 2 isoform X3	100,00
<i>Mvp</i>	Major vault protein isoform X1	100,00
<i>Clasp1</i>	CLIP-associating protein 1 isoform X1	100,00
<i>Coasy</i>	Bifunctional coenzyme A synthase	100,00
<i>LOC101826350</i>	Polyadenylate-binding protein; Binds the poly(A) tail of mRNA	100,00
<i>Nova1</i>	RNA-binding protein Nova-1-like	100,00
<i>Nos1</i>	Nitric oxide synthase; Produces nitric oxide (NO)	100,00
<i>Cyfp1</i>	Cytoplasmic fmr1-interacting protein	100,00
<i>Dmtn</i>	Dematin isoform X1	100,00
<i>Slc12a6</i>	Solute carrier family 12 member 6 isoform X1	100,00
<i>Rab11fip5</i>	Rab11 family-interacting protein 5 isoform X1	100,00
<i>Pgrmc2</i>	Membrane-associated progesterone receptor component 2	100,00
<i>Lin7a</i>	Protein lin-7 homolog	100,00
<i>Tfrc</i>	Transferrin receptor protein 1	100,00
<i>Rtn4ip1</i>	reticulon-4-interacting protein 1, mitochondrial isoform X1	100,00
<i>Mtor</i>	Serine/threonine-protein kinase mtor	100,00
<i>Ttyh3</i>	Protein tweety homolog; Probable chloride channel	100,00
<i>Cpne5</i>	Copine-5 isoform X2; Copine-5	100,00
<i>Acsf3</i>	long-chain-fatty-acid--CoA ligase 3-like isoform X1	100,00
<i>Lcp1</i>	Plastin-2	100,00
<i>Myo18a</i>	Unconventional myosin-XVIIIa isoform X1	100,00
<i>Mapk8</i>	Mitogen-activated protein kinase 8 isoform X3	100,00
<i>Pbxip1</i>	Pre-B-cell leukemia transcription factor-interacting protein 1 isoform x5	100,00
<i>Plin3</i>	Perilipin-3	100,00
<i>Hmgcs1</i>	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase	100,00
<i>Tbrg4</i>	Protein TBRG4 isoform X1	100,00
<i>Arl3</i>	ADP-ribosylation factor-like protein 3	100,00
<i>Guk1</i>	Guanylate kinase isoform X1	100,00
<i>Uba3</i>	Regulatory subunit of the dimeric UBA3-NAE1 E1 enzyme	100,00

<i>Srcin1</i>	Src kinase signaling inhibitor 1 isoform x13; SRC kinase signaling inhibitor 1	100,00
<i>Epb41</i>	Erythrocyte Membrane Protein Band 4.1	100,00
<i>Anapc5</i>	Anaphase-promoting complex subunit 5-like	100,00
<i>GNPDA1</i>	Glucosamine-6-phosphate isomerase 1	100,00
<i>Ric8a</i>	synembryn-A isoform X1	100,00
<i>Clvs2</i>	Clavesin-2 isoform X2; Clavesin-2-like	100,00
<i>Arfgef3</i>	Brefeldin a-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 3 isoform x2	100,00
<i>Acs1l</i>	long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1 isoform X1	100,00
<i>Vps51</i>	Vacuolar protein sorting-associated protein 51 homolog	100,00
<i>Cfap36</i>	Cilia- and flagella-associated protein 36	100,00
<i>Eps15</i>	Epidermal growth factor receptor substrate 15	100,00
<i>Rpl9</i>	60S ribosomal protein L9	100,00
<i>Ttc7b</i>	Tetratricopeptide repeat protein 7b isoform x2	100,00
<i>Blvra</i>	Biliverdin reductase a	100,00
<i>Stx4</i>	syntaxin-4 isoform X2; Syntaxin-4 isoform X1	100,00
<i>Pthp2</i>	Polypyrimidine tract-binding protein 2 isoform X1	100,00
<i>Kif1a</i>	Kinesin-like protein KIF1A isoform X1	100,00
<i>Thumpd1</i>	THUMP domain-containing protein 1	100,00
<i>Golph3</i>	Golgi phosphoprotein 3 isoform x1; Golgi phosphoprotein 3	100,00
<i>Decr1</i>	2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial	100,00
<i>Arhgap44</i>	Rho gtpase-activating protein 44 isoform x3	100,00
<i>Rragd</i>	Ras-related gtp-binding protein d isoform x1	100,00
<i>Cdk5rap3</i>	CDK5 regulatory subunit-associated protein 3 isoform X1	100,00
<i>LOC101835570</i>	Cholesterol 24-hydroxylase-like isoform X1	100,00
<i>Galk1</i>	Galactokinase	100,00
<i>U2af114</i>	Splicing factor U2AF 26 kDa subunit isoform X1	100,00
<i>Gria4</i>	Glutamate receptor 4 isoform X1	100,00
<i>Scpep1</i>	Carboxypeptidase; Retinoid-inducible serine carboxypeptidase	100,00
<i>Gria3</i>	Glutamate receptor 3 isoform X4	100,00
<i>Mypn</i>	Myopalladin isoform x2; Myopalladin isoform X1	100,00
<i>Nrxn3</i>	Neurexin 3 isoform x12; Neurexin-3-beta isoform X1	100,00
<i>Ptp4a1</i>	Protein tyrosine phosphatase type IVA 1 isoform X1	100,00
<i>Oscp1</i>	Protein oscp1 isoform x2; Protein OSCP1-like	100,00
<i>Prdx4</i>	Peroxiredoxin-4	100,00
<i>Kcnj10</i>	Atp-sensitive inward rectifier potassium channel 10 isoform x1	100,00
<i>Htra2</i>	Serine protease HTRA2, mitochondrial isoform X1	100,00
<i>Scfd2</i>	Sec1 family domain-containing protein 2 isoform X1	100,00
<i>Msi2</i>	RNA-binding protein Musashi homolog 2 isoform X1	100,00
<i>Osbpl2</i>	Oxysterol-binding protein-related protein 2 isoform X1	100,00
<i>Maip1</i>	M-aaa protease-interacting protein 1, mitochondrial; Uncharacterized protein	100,00
<i>Hmgb2</i>	C2orf47 homolog, mitochondrial	100,00
<i>Srsf1</i>	High mobility group protein B2	100,00
<i>Tecr</i>	Serine/arginine-rich splicing factor 1	100,00
<i>Adprhl2</i>	Very-long-chain enoyl-CoA reductase isoform X1	100,00
<i>Atg4b</i>	Poly(adp-ribose) glycohydrolase arh3 isoform x1	100,00
<i>Gripap1</i>	Cysteine protease required for the cytoplasm to vacuole transport (Cvt) and autophagy	100,00
	GRIP1-associated protein 1 isoform X1	100,00

<i>Lypla2</i>	Acyl-protein thioesterase 2	100,00
<i>Cyth1</i>	Cytohesin-1 isoform X2; Cytohesin-1	100,00
<i>Sptbn4</i>	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 4 isoform X1	100,00
<i>Ddah2</i>	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 isoform X1	100,00
<i>Slirp</i>	SRA stem-loop-interacting RNA-binding protein, mitochondrial	100,00
<i>Agap3</i>	ArfGAP With GTPase Domain, Ankyrin Repeat And PH Domain 3	100,00
<i>Smcr8</i>	Guanine nucleotide exchange protein smcr8; smith-Magenis syndrome chromosomal region candidate gene 8 protein homolog	100,00
<i>Nlgn1</i>	Neurologin-1 isoform X1	100,00
<i>Acaa1</i>	3-ketoacyl-CoA thiolase, peroxisomal	100,00
<i>Gale</i>	Udp-glucose 4-epimerase	100,00
<i>Serpinb8</i>	Serpin B8	100,00
<i>Clic1</i>	Chloride intracellular channel protein 1	100,00
<i>Sgtb</i>	Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein beta	100,00
<i>Puf60</i>	Poly(u)-binding-splicing factor puf60 isoform x1	100,00
<i>Sv2c</i>	Synaptic vesicle glycoprotein 2C	100,00
<i>Cntn2</i>	contactin-2; LOW QUALITY PROTEIN: contactin 2 (axonal)	100,00
<i>Htt</i>	Huntingtin	100,00
<i>Dmxl2</i>	Dmx Like 2	100,00
<i>Mgll</i>	LOW QUALITY PROTEIN: monoglyceride lipase	100,00
<i>Stxbp3</i>	Syntaxin-binding protein 3	100,00
<i>LOC101841832</i>	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type 1D	100,00
<i>U2af2</i>	U2 snRNP auxiliary factor large subunit	100,00
<i>Macf1</i>	Microtubule-actin cross-linking factor 1, isoforms 1/2/3/5 isoform X1	100,00
<i>Dnah11</i>	Dynein heavy chain 11, axonemal	100,00
<i>Kcnk5</i>	Potassium channel subfamily K member 5	100,00
<i>Ckap4</i>	Cytoskeleton-associated protein 4	100,00
<i>Cryz</i>	Quinone oxidoreductase	100,00
<i>Miga2</i>	Mitoguardin 2 isoform x1	100,00
<i>Strn</i>	Striatin isoform X2; Striatin	18,05
<i>Brsk2</i>	Serine/threonine-protein kinase BRSK2 isoform X1	14,77
<i>Vgf</i>	Neurosecretory protein VGF	14,62
<i>Gria2</i>	Glutamate receptor 2 isoform X1	13,79
<i>Nap1l1</i>	Nucleosome assembly protein 1-like 1 isoform X3	13,67
<i>Lgalsl</i>	Galectin-related protein	12,50
<i>Atp2b3</i>	ATPase Plasma Membrane Ca2+ Transporting 3	12,49
<i>Chordc1</i>	Cysteine and histidine-rich domain-containing protein 1	12,49
<i>Ppp6c</i>	Serine/threonine-protein phosphatase 6 catalytic subunit isoform X1	11,94
<i>Acox1</i>	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1 isoform X2	9,91
<i>Ube4b</i>	Ubiquitin conjugation factor E4 B isoform X1	9,51
<i>Omg</i>	Oligodendrocyte-myelin glycoprotein	9,04
<i>Syt7</i>	Synaptotagmin 7	8,88
<i>Cplx2</i>	Complexin-2-like	7,68
<i>Slc6a5</i>	Transporter; Sodium- and chloride-dependent glycine transporter 2	7,37
<i>Plcd1</i>	Phosphoinositide phospholipase C1	6,97
<i>Lars</i>	Leucyl-TRNA Synthetase 1	6,79
<i>Syn3</i>	synapsin-3 isoform X1; Synapsin-3 isoform X2	6,61
<i>Jup</i>	Junction plakoglobin	6,36

<i>Dctn4</i>	Dynactin subunit 4 isoform X1	6,14
<i>Ilf2</i>	Interleukin enhancer-binding factor 2 isoform X1	6,14
<i>Etfdh</i>	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, mitochondrial	5,81
<i>Anxa7</i>	Annexin A7 isoform X1	5,61
<i>Hsd1l</i>	Inactive hydroxysteroid dehydrogenase-like protein 1	5,55
<i>Erlin2</i>	Erlin-2	5,51
<i>LOC101838460</i>	Protein transport protein Sec31A-like	5,33
<i>Scamp1</i>	Secretory Carrier Membrane Protein 1	5,28
<i>Cul1</i>	Cullin-1	5,27
<i>Dhtkd1</i>	Probable 2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component DHKTD1, mitochondrial	5,14
<i>Stx12</i>	Syntaxin-12	5,04
<i>Eif3e</i>	Eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF-3) complex	5,03
<i>Prrt2</i>	Proline-rich transmembrane protein 2	4,99
<i>Dpp3</i>	Dipeptidyl peptidase 3 isoform X1	4,98
<i>Lamp2</i>	Lysosome-associated membrane glycoprotein 2 isoform x1	4,94
<i>Thop1</i>	Thimet oligopeptidase	4,90
<i>Sar1a</i>	GTP-binding protein SAR1a	4,90
<i>Rad23b</i>	UV excision repair protein RAD23 homolog B	4,78
<i>Farsb</i>	Phenylalanyl-TRNA Synthetase Subunit Beta	4,74
<i>LOC110343394</i>	F-box only protein 44 isoform X1	4,68
<i>Gdap1l1</i>	Ganglioside Induced Differentiation Associated Protein 1 Like 1	4,57
<i>Golga7</i>	Golgin subfamily A member 7	4,55
<i>Kyat1</i>	Kynurenine--oxoglutarate transaminase 1 isoform x3	4,52
<i>Mtx3</i>	Metaxin-3 isoform X1; LOW QUALITY PROTEIN: metaxin-3	4,33
<i>LOC110342274</i>	Hydroxyacyl-thioester dehydratase type 2, mitochondrial-like	4,30
<i>Tubb6</i>	Tubulin Beta 6 Class V	4,27
<i>LOC101831032</i>	Vacuolar protein sorting-associated protein 4B-like	4,21
<i>Rgs6</i>	Regulator of g-protein signaling 6 isoform x3; Regulator of G-protein signaling 6	4,15
<i>Copa</i>	COPI Coat Complex Subunit Alpha	4,06
<i>Capza1</i>	F-actin-capping protein subunit alpha	3,98
<i>Prune1</i>	Exopolyphosphatase prune1; Protein prune homolog	3,96
<i>Plcl1</i>	Phosphoinositide phospholipase c; Inactive phospholipase C-like protein 1	3,85
<i>LOC101839336</i>	Isochorismatase domain-containing protein 2B, mitochondrial-like	3,84
<i>Sacm1l</i>	Phosphatidylinositide phosphatase SAC1	3,83
<i>LOC101836945</i>	Oxysterol-binding protein-related protein 1	3,82
<i>Mpst</i>	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	3,79
<i>Acadsb</i>	Short/branched chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	3,76
<i>Atcay</i>	Caytaxin	3,75
<i>Paics</i>	Phosphoribosylaminoimidazole Carboxylase And Phosphoribosylaminoimidazolesuccinocarboxamide Synthase	3,69
<i>LOC101841963</i>	Gmp synthase [glutamine-hydrolyzing] isoform x2	3,62
<i>Nnt</i>	NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial	3,61
<i>Mlycd</i>	malonyl-CoA decarboxylase, mitochondrial	3,52
<i>Hddc2</i>	Hd domain-containing protein 2 isoform x1; HD domain-containing protein 2	3,51
<i>Anxa4</i>	Annexin A4	3,49
<i>Cpe</i>	Carboxypeptidase E	3,41
<i>Gbe1</i>	1,4-alpha-glucan-branching enzyme-like	3,37

<i>Rab22a</i>	Ras-related protein rab-22a isoform x3; Ras-related protein Rab-22A	3,32
<i>Asl</i>	Argininosuccinate lyase-like isoform X1	3,31
<i>Sparcl1</i>	SPARC-like protein 1	3,29
<i>Mpp1</i>	55 kDa erythrocyte membrane protein isoform X1	3,26
<i>Ap3m2</i>	AP-3 complex subunit mu-2	3,26
<i>Hexb</i>	Beta-hexosaminidase subunit beta	3,26
<i>Vps53</i>	Vacuolar protein sorting-associated protein 53 homolog isoform X1	3,23
<i>Vamp3</i>	Vesicle-associated membrane protein 3	3,22
<i>Git1</i>	ARF GTPase-activating protein GIT1 isoform X1	3,22
<i>Acan</i>	Aggrecan core protein isoform x2	3,21
<i>Map4</i>	Microtubule-associated protein 4	3,20
<i>Ctnna1</i>	Catenin alpha-1 isoform X1	3,20
<i>Psmd5</i>	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 5 isoform X1	3,19
<i>Mcu</i>	Calcium uniporter protein, mitochondrial isoform X1	3,19
<i>Rtn3</i>	Reticulon-3	3,18
<i>Tom1</i>	Target of myb protein 1 isoform x2; Target of Myb protein 1	3,17
<i>Chl1</i>	Neural cell adhesion molecule L1-like protein	3,10
<i>Ube2o</i>	Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 O	3,09
<i>Tmed9</i>	Transmembrane emp24 domain-containing protein 9	3,07
<i>Dusp3</i>	Dual specificity protein phosphatase 3	3,06
<i>Ctnna2</i>	Catenin alpha-2 isoform X1	3,06
<i>Fetub</i>	fetuin-B	3,05
<i>Pitpnm1</i>	Membrane-associated phosphatidylinositol transfer protein 1 isoform x1	3,03
<i>Actr10</i>	Actin Related Protein 10	3,00
<i>Anp32a</i>	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A isoform X1	3,00
<i>Ppp2r5c</i>	Protein Phosphatase 2 Regulatory Subunit B'Gamma	3,00
<i>LOC106023045</i>	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP], mitochondrial	3,00
<i>Acy1</i>	aminoacylase-1A-like isoform X1	2,92
<i>Gfm1</i>	Elongation factor g, mitochondrial 1	2,89
<i>Cul5</i>	Cullin-5	2,89
<i>Mut</i>	methylmalonyl-CoA mutase, mitochondrial	2,87
<i>Pacsin2</i>	Protein Kinase C And Casein Kinase Substrate In Neurons 2	2,87
<i>Sec22b</i>	Vesicle-trafficking protein SEC22b-like	2,83
<i>Sncg</i>	Gamma-synuclein	2,83
<i>Ap1s1</i>	Adaptor Related Protein Complex 1 Subunit Sigma 1	2,83
<i>Bsg</i>	Basigin isoform x3; Basigin isoform X1	2,82
<i>Aldh1l1</i>	Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member L1	2,82
<i>Sgip1</i>	SH3-containing GRB2-like protein 3-interacting protein 1 isoform X1	2,80
<i>Dcxr</i>	L-xylulose reductase;	2,79
<i>Txn1l</i>	Thioredoxin-like protein 1 isoform x1; Thioredoxin-like protein 1	2,79
<i>Gga1</i>	ADP-ribosylation factor-binding protein GGA1	2,78
<i>Nudt2</i>	Bis(5'-nucleosyl)-tetraphosphatase [asymmetrical]	2,76
<i>Synj2bp</i>	Synaptojanin-2-binding protein	2,75
<i>Eif2s3</i>	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3-like isoform X1	2,73
<i>Slc6a17</i>	Transporter; Sodium-dependent neutral amino acid transporter SLC6A17	2,71
<i>Plip</i>	Plasmolipin	2,71
<i>Cars</i>	cysteine--tRNA ligase, cytoplasmic	2,69
<i>Kctd14</i>	BTB/POZ domain-containing protein KCTD14	2,68

<i>Ampd2</i>	AMP deaminase 2 isoform X1Adenosine and AMP deaminases family	2,66
<i>Xpo7</i>	Low quality protein: exportin-7; Exportin-7 isoform X1	2,66
<i>Sptb</i>	Spectrin Beta, Erythrocytic	2,65
<i>Apool</i>	Micos complex subunit	2,65
<i>Padi2</i>	Protein-arginine deiminase type-2	2,64
<i>ND5</i>	NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Core Subunit 5	2,64
<i>Gabrg2</i>	Gamma-aminobutyric acid receptor subunit gamma-2	2,64
<i>Cmas</i>	N-acylneuraminate cytidyltransferase	2,64
<i>Ndufs4</i>	Nadh dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 4, mitochondrial isoform x1	2,62
<i>Esyt1</i>	Extended synaptotagmin-1	2,61
<i>Pfas</i>	Phosphoribosylformylglycinamide synthase	2,61
<i>Tpbg</i>	Trophoblast glycoprotein isoform X1	2,57
<i>Cbr4</i>	Carbonyl reductase family member 4	2,56
<i>Psph</i>	Phosphoserine Phosphatase	2,56
<i>Ppp2r5d</i>	Serine/threonine-protein phosphatase 2a 56 kda regulatory subunit.	2,55
<i>Srsf5</i>	Serine/arginine-rich splicing factor 5 isoform X1	2,55
<i>Pex5l</i>	PEX5-related protein isoform X3; PEX5-related protein isoform X1	2,53
<i>Ezr</i>	Ezrin	2,53
<i>Phpt1</i>	14 kDa phosphohistidine phosphatase	2,52
<i>Osbp</i>	Oxysterol-binding protein 1	2,52
<i>Slc17a6</i>	Vesicular glutamate transporter 2 isoform x1; Vesicular glutamate transporter 2	2,52
<i>Mccc1</i>	methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha, mitochondrial	2,52
<i>Ankfy1</i>	Rabankyrin-5; Ankyrin repeat and FYVE domain-containing protein 1	2,50
<i>Pcyox1l</i>	Prenylcysteine oxidase-like	2,49
<i>Slc12a2</i>	Solute carrier family 12 member 2 isoform X1	2,49
<i>Camk1</i>	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type 1	2,47
<i>Pcyox1</i>	Prenylcysteine oxidase 1; Prenylcysteine oxidase-like	2,46
<i>Kctd12</i>	BTB/POZ domain-containing protein KCTD12	2,45
<i>Tmx3</i>	Protein disulfide-isomerase TMX3-like	2,45
<i>Rogdi</i>	Protein rogdi homolog isoform x1	2,44
<i>Endod1</i>	Endonuclease domain-containing 1 protein	2,44
<i>Psmc1</i>	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1 isoform X1	2,43
<i>Prmt5</i>	Protein arginine N-methyltransferase 5-like	2,42
<i>Ptprz1</i>	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase zeta isoform X1	2,42
<i>Fn3krp</i>	ketosamine-3-kinase	2,40
<i>Elp3</i>	Elongator Acetyltransferase Complex Subunit 3	2,40
<i>Ganab</i>	Neutral alpha-glucosidase AB isoform X1	2,40
<i>Prkar1a</i>	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit	2,39
<i>LOC101844122</i>	Nadh dehydrogenase [ubiquinone] 1 subunit c2	2,38
<i>Tstd3</i>	Thiosulfate sulfurtransferase/rhodanese-like domain-containing protein 3	2,34
<i>Hmox2</i>	Heme oxygenase 2	2,34
<i>Palm</i>	Paralemmin-1 isoform X1; Paralemmin-1	2,33
<i>Prkra</i>	Protein Activator Of Interferon Induced Protein Kinase EIF2AK2	2,33
<i>Ppid</i>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D	2,32
<i>BDH1</i>	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase, mitochondrial	2,32
<i>Ehbp1</i>	EH domain-binding protein 1 isoform X2	2,32
<i>Appl1</i>	DCC-interacting protein 13-alpha	2,31

<i>LOC101843673</i>	Mitochondrial chaperone bcs1 isoform x1	2,30
<i>Stxbp6</i>	Syntaxin-binding protein 6	2,30
<i>Faf2</i>	FAS-associated factor 2 isoform X1	2,28
<i>Cndp2</i>	Cytosolic non-specific dipeptidase isoform X1	2,27
<i>Csrp1</i>	Cysteine and glycine-rich protein 1	2,27
<i>Hsd17b8</i>	Estradiol 17-beta-dehydrogenase 8	2,26
<i>Alcam</i>	CD166 antigen isoform X1	2,26
<i>Sv2b</i>	Synaptic vesicle glycoprotein 2B-like	2,25
<i>Rpl23</i>	60S ribosomal protein L23	2,25
<i>Tfg</i>	Protein TFG	2,25
<i>Rpl12</i>	60S ribosomal protein L12 isoform X1	2,21
<i>Rps12</i>	40S ribosomal protein S12	2,21
<i>Eif4a1</i>	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4A1	2,20
<i>Ahi1</i>	Jouberin isoform x3; Jouberin isoform X1; Jouberin	2,20
<i>LOC101830140</i>	40S ribosomal protein S21-like	2,20
<i>Stoml2</i>	Stomatin-like protein 2, mitochondrial isoform x1	2,19
<i>AcsM5</i>	Acyl-coenzyme A synthetase ACSM5, mitochondrial	2,19
<i>Pcca</i>	propionyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial	2,19
<i>Ptprs</i>	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase S	2,19
<i>Vbp1</i>	Prefoldin subunit 3	2,18
<i>LOC101833108</i>	Dehydrogenase/reductase SDR family member 4	2,18
<i>Pdia4</i>	Protein disulfide-isomerase A4	2,18
<i>Ube2k</i>	Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 K	2,17
<i>Hars</i>	histidine--tRNA ligase, cytoplasmic	2,17
<i>HSD11B1</i>	Corticosteroid 11-beta-dehydrogenase isozyme 1	2,17
<i>Rap1gap</i>	Rap1 GTPase-activating protein 1 isoform X1	2,17
<i>Pitrm1</i>	Presequence protease, mitochondrial isoform X2	2,16
<i>Gfap</i>	Glial fibrillary acidic protein	2,16
<i>LOC101824618</i>	NADH-cytochrome b5 reductase 1-like	2,15
<i>Fabp3</i>	Fatty-acid binding protein (FABP) family	2,15
<i>Nln</i>	Neurolysin, mitochondrial	2,15
<i>Adssl1</i>	Adenylosuccinate synthetase isozyme 1	2,14
<i>Rheb</i>	GTP-binding protein Rheb	2,14
<i>Arhgap1</i>	Rho GTPase-activating protein 1	2,14
<i>Fga</i>	Fibrinogen alpha chain	2,14
<i>Brox</i>	BRO1 domain-containing protein BROX isoform X1	2,14
<i>Gjc3</i>	Gap junction protein	2,13
<i>Ddc</i>	aromatic-L-amino-acid decarboxylase isoform X1	2,13
<i>Tbce</i>	Tubulin-specific chaperone E isoform X1	2,13
<i>Mtap</i>	Methylthioadenosine Phosphorylase	2,13
<i>Rabgap1</i>	Rab gtpase-activating protein 1 isoform x1	2,13
<i>Gk</i>	Glycerol kinase isoform x3; Glycerol kinase isoform X1	2,13
<i>Slc25a25</i>	Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-2 isoform X2	2,13
<i>Tmem65</i>	Transmembrane protein 65	2,12
<i>Ogt</i>	O-Linked N-Acetylglucosamine (GlcNAc) Transferase	2,12
<i>Pdcd6</i>	Programmed cell death protein 6 isoform X1	2,11
<i>Ilk</i>	Integrin-linked protein kinase isoform X1	2,11
<i>Ipo4</i>	Importin-4	2,11

<i>Tmx2</i>	Thioredoxin-related transmembrane protein 2 isoform X1	2,10
<i>Tpm4</i>	Tropomyosin alpha-4 chain isoform x2	2,10
<i>Pak1</i>	Serine/threonine-protein kinase PAK 1	2,10
<i>Cd9</i>	Tetraspanin CD9	2,09
<i>Caps</i>	Calcyphosin isoform X1	2,09
<i>Rab12</i>	Ras-related protein Rab-12	2,09
<i>Hyi</i>	Putative hydroxypyruvate isomerase	2,08
<i>Fnta</i>	Farnesyltransferase, CAAX Box, Alpha	2,07
<i>Rps5</i>	40S ribosomal protein S5-like	2,07
<i>GRK2</i>	G Protein-Coupled Receptor Kinase 2	2,06
<i>Dnajb1</i>	dnaJ homolog subfamily B member 1	2,05
<i>Fkbp8</i>	Peptidylprolyl isomerase 8	2,05
<i>Echdc2</i>	enoyl-CoA hydratase domain-containing protein 2, mitochondrial isoform X1	2,05
<i>Tp53bp1</i>	TP53-binding protein 1 isoform X1	2,04
<i>Rptor</i>	Regulatory-associated protein of mTOR	2,04
<i>Pgm2l1</i>	Glucose 1,6-bisphosphate synthase	2,03
<i>Vcl</i>	Vinculin isoform X1	2,03
<i>Tmx4</i>	Thioredoxin-related transmembrane protein 4	2,02
<i>Nckap1</i>	Nck-associated protein 1 isoform X1	2,00
<i>LOC101842058</i>	Cytochrome c, somatic-like	0,50
<i>Clasp2</i>	CLIP-associating protein 2 isoform X1	0,49
<i>Wasf3</i>	Wiskott-aldrich syndrome protein family member 3 isoform x1	0,49
<i>Ank3</i>	ankyrin-3 isoform X26; Ankyrin-3 isoform X1	0,49
<i>Spag9</i>	Sperm Associated Antigen 9	0,49
<i>Ndr4</i>	Protein ndrg4 isoform x1	0,48
<i>Slc4a1</i>	Solute Carrier Family 4 Member 1	0,48
<i>Dhdh</i>	Trans-1,2-dihydrobenzene-1,2-diol dehydrogenase	0,48
<i>Cul2</i>	Cullin-2 Belongs to the cullin family	0,48
<i>Sirt5</i>	Nad-dependent protein deacylase sirtuin-5, mitochondrial	0,48
<i>Ube2d1</i>	Ubiquitin-conjugating enzyme e2 d1 isoform x1	0,48
<i>Atp8a1</i>	Probable phospholipid-transporting ATPase IA isoform X1;	0,47
<i>Aldh3a2</i>	Fatty aldehyde dehydrogenase	0,47
<i>Hacd3</i>	3-Hydroxyacyl-CoA Dehydratase 3	0,47
<i>Ola1</i>	Olg-like atpase 1	0,47
<i>Grhpr</i>	Glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase isoform X1	0,47
<i>Cpne1</i>	Copine-1 isoform X2	0,46
<i>L1cam</i>	Neural cell adhesion molecule L1 isoform X1	0,46
<i>Tpp2</i>	Tripeptidyl-peptidase 2	0,46
<i>Epm2aip1</i>	EPM2A-interacting protein 1	0,46
<i>Ide</i>	Insulin-degrading enzyme	0,45
<i>Cacna2d2</i>	Voltage-dependent calcium channel subunit alpha-2/delta-2 isoform X1	0,45
<i>Myh10</i>	Myosin-10	0,45
<i>Sec24c</i>	Protein transport protein Sec24C	0,45
<i>LOC101833678</i>	Hemoglobin subunit beta-like	0,44

<i>Nefh</i>	Neurofilament heavy polypeptide	0,44
<i>Acot13</i>	Acyl-coenzyme A thioesterase 13	0,44
<i>Ndrp1</i>	Protein NDRG1	0,44
<i>Apeh</i>	Acylamino-acid-releasing enzyme	0,44
<i>Rpl27</i>	60S ribosomal protein L27	0,44
<i>Gsn</i>	Gelsolin isoform X1	0,44
<i>LOC101841805</i>	Cytochrome c oxidase subunit 7A2, mitochondrial-like	0,43
<i>LOC101829167</i>	cystatin-C-like	0,43
<i>Ndufa5</i>	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 5	0,43
<i>Fxr2</i>	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 2	0,43
<i>G3bp2</i>	Ras GTPase-activating protein-binding protein 2 isoform X1	0,43
<i>Hdgf</i>	Hepatoma-derived growth factor isoform X1	0,43
<i>Ptpn9</i>	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 9	0,42
<i>Cotl1</i>	Coactosin-like protein	0,42
<i>LOC106022755</i>	Serine/threonine-protein kinase dclk2-like isoform x2	0,41
<i>Rab4a</i>	Ras-related protein Rab-4A isoform X1	0,41
<i>Ttr</i>	Transthyretin	0,41
<i>Ckap5</i>	Cytoskeleton-associated protein 5	0,40
<i>Cdc42</i>	Cell division control protein 42 homolog isoform X1	0,40
<i>Arl6ip5</i>	PRA1 family protein 3	0,40
<i>Ly6h</i>	Lymphocyte antigen 6H isoform X1	0,40
<i>Nme3</i>	Nucleoside diphosphate kinase 3 isoform X2	0,40
<i>LOC101839254</i>	Solute carrier family 2	0,39
<i>Astn1</i>	Astrotactin-1 isoform X1	0,39
<i>Reep5</i>	Receptor expression-enhancing protein 5	0,38
<i>Sh3bgrl</i>	SH3 Domain Binding Glutamate Rich Protein Like	0,38
<i>Vma21</i>	Vacuolar atpase assembly integral membrane protein vma21	0,38
<i>LOC101834751</i>	methionine--tRNA ligase, cytoplasmic	0,37
<i>Arpc3</i>	Actin Related Protein 2/3 Complex Subunit 3	0,37
<i>Dnajc5</i>	dnaJ homolog subfamily C member 5 isoform X1	0,37
<i>Esyt2</i>	Extended synaptotagmin-2	0,37
<i>Tbcd</i>	Tubulin-specific chaperone D	0,36
<i>Psmc8</i>	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8	0,36
<i>Ndufa4</i>	Cytochrome c oxidase subunit NDUFA4	0,35
<i>Ndufb6</i>	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 6 isoform X1	0,35
<i>Cdk14</i>	Cyclin-dependent kinase 14 isoform X1	0,34
<i>Rabggta</i>	Geranylgeranyl transferase type-2 subunit alpha	0,34
<i>Sarm1</i>	Sterile alpha and TIR motif-containing protein 1	0,34
<i>Hnrnpa1</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 isoform X1	0,33
<i>Fgb</i>	Fibrinogen beta chain	0,32
<i>Crk</i>	Adapter molecule crk isoform X1	0,32
<i>Agpat1</i>	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase alpha	0,32

<i>Mblac2</i>	Metallo-beta-lactamase domain-containing protein 2 isoform x1	0,32
<i>Ncs1</i>	Neuronal Calcium Sensor 1	0,32
<i>Cmtm5</i>	CKLF-like MARVEL transmembrane domain-containing protein 5	0,32
<i>Psmb4</i>	Proteasome subunit beta	0,32
<i>Trappc6b</i>	Trafficking protein particle complex subunit 6B	0,31
<i>Adsl</i>	Adenylosuccinate lyase isoform X1	0,31
<i>Prkar1b</i>	cAMP-dependent protein kinase type I-beta regulatory subunit	0,31
<i>Brk1</i>	Protein BRICK1 isoform X1	0,31
<i>LOC101843100</i>	Glutathione s-transferase omega-1-like isoform x1	0,30
<i>LOC101844224</i>	Myosin regulatory light chain RLC-A isoform X1	0,30
<i>Ubxn6</i>	Ubx domain-containing protein 6 isoform x1	0,30
<i>LOC101843823</i>	Alpha-1-inhibitor 3-like	0,29
<i>Enoph1</i>	Enolase-Phosphatase 1	0,29
<i>Nt5c</i>	5'(3')-deoxyribonucleotidase, cytosolic type	0,28
<i>Rab8a</i>	RAB8A, Member RAS Oncogene Family	0,28
<i>Ssb</i>	Lupus La protein homolog	0,28
<i>Dync1li1</i>	Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1 isoform X1	0,28
<i>Rpn2</i>	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2	0,27
<i>Sh3gl3</i>	Endophilin-A3	0,27
<i>Pcbp2</i>	poly(rC)-binding protein 2 isoform X1	0,27
<i>Pip4k2c</i>	Phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase type-2 gamma isoform X1	0,27
<i>Nono</i>	non-POU domain-containing octamer-binding protein	0,27
<i>Sept9</i>	Septin-9 isoform X1	0,26
<i>Nefm</i>	Neurofilament medium polypeptide	0,26
<i>Ephx1</i>	Epoxide Hydrolase 1	0,26
<i>Farsa</i>	phenylalanine--tRNA ligase alpha subunit isoform X1	0,26
<i>Nit2</i>	Omega-amidase NIT2	0,25
<i>Rpl23a</i>	60S ribosomal protein L23a	0,24
<i>Cpm</i>	Carboxypeptidase M	0,24
<i>Ptprn2</i>	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase N2-like	0,24
<i>Ufd1</i>	Ubiquitin recognition factor in er-associated degradation protein 1 isoform x1	0,22
<i>S100b</i>	Protein S100-B	0,21
<i>Mapre3</i>	Microtubule-associated protein RP/EB family member 3 isoform X1	0,21
<i>Copb1</i>	Coatomer subunit beta	0,20
<i>Srsf2</i>	Serine/arginine-rich splicing factor 2 isoform X1	0,19
<i>Serpina1</i>	Serpin Family A Member 1	0,19
<i>Ndufb1</i>	Nadh dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 1	0,18
<i>Myo1d</i>	Unconventional myosin-id isoform x1	0,18
<i>Strn4</i>	Striatin-4 isoform X1	0,18
<i>Matr3</i>	Matrin-3-like isoform X1	0,18
<i>Tarsl2</i>	Probable threonine--tRNA ligase 2, cytoplasmic	0,16
<i>Aimp1</i>	Aminoacyl trna synthase complex-interacting multifunctional protein 1 isoform x1	0,16

<i>Pi4ka</i>	Phosphatidylinositol 4-kinase alpha	0,16
<i>Upf1</i>	Regulator of nonsense transcripts 1 isoform x4	0,16
<i>Psmb7</i>	Proteasome subunit beta type-7	0,15
<i>LOC101843256</i>	Belongs to the histone H2B family	0,15
<i>LOC101825928</i>	Histone h4	0,15
<i>Baiap2</i>	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2 isoform X1	0,13
<i>Rasgrp2</i>	RAS guanyl-releasing protein 2 isoform X1	0,12
<i>Get4</i>	Golgi to ER traffic protein 4 homolog	0,12
<i>Ctnnd2</i>	Catenin Delta 2	0,12
<i>S100a1</i>	Protein S100-A1	0,12
<i>LOC101828166</i>	Dehydrogenase/reductase SDR family member 7-like	0,12
<i>Tspyl4</i>	Testis-specific Y-encoded-like protein 4	0,10
<i>Csk</i>	Tyrosine-protein kinase CSK isoform X1	0,08
<i>Dnaja3</i>	Dnaj homolog subfamily a member 3, mitochondrial isoform x1	0,07
<i>Ehd1</i>	EH domain-containing protein 1	0,06
<i>Ca3</i>	Carbonic anhydrase 3	0,06
<i>Mon2</i>	Protein MON2 homolog	0,05
<i>Btf3</i>	Transcription factor BTF3 isoform X1	0,04
<i>Ppp1cb</i>	Protein Phosphatase 1 Catalytic Subunit Beta	0,04
<i>LOC101844912</i>	PRAME family member 12-like	0,00
<i>LOC110342531</i>	dynamin-2-like	0,00
<i>LOC101830505</i>	ADP-ribosylation factor 2-like isoform X1	0,00
<i>Pgk2</i>	Phosphoglycerate kinase 2	0,00
<i>Myh9</i>	Myosin-9	0,00
<i>Klc4</i>	Kinesin light chain 4	0,00
<i>Gnat1</i>	Guanine nucleotide-binding protein G(t) subunit alpha-1	0,00
<i>Ppm1e</i>	Protein phosphatase 1E	0,00
<i>Bnip2</i>	BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 2 isoform X1	0,00
<i>Fam49a</i>	Protein FAM49A	0,00
<i>Rnmt</i>	mRNA cap guanine-N7 methyltransferase	0,00
<i>Cdk18</i>	Cyclin Dependent Kinase 18	0,00
<i>Dars2</i>		0,00
<i>Fkbp2</i>	Peptidylprolyl isomerase; Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP2 isoform X1	0,00
<i>Srr</i>	Serine racemase isoform X1	0,00
<i>CUNH22orf46</i>	Uncharacterized protein c22orf46 homolog	0,00
<i>Aip</i>	AH receptor-interacting protein	0,00
<i>Gmpr</i>	Gmp reductase	0,00
<i>Atox1</i>	Copper transport protein atox1 isoform x2	0,00
<i>Slc4a10</i>	Sodium-driven chloride bicarbonate exchanger isoform X1	0,00
<i>Gng4</i>	Aspartyl-TRNA Synthetase 2, Mitochondrial	0,00
<i>Pcsk1n</i>	proSAAS	0,00
<i>Dab2ip</i>	Disabled homolog 2-interacting protein isoform X1	0,00

<i>Rab9b</i>	Ras-related protein Rab-9B	0,00
<i>Tmed2</i>	Transmembrane emp24 domain-containing protein 2	0,00
<i>Srp72</i>	Signal recognition particle subunit srp72	0,00
<i>Nudt21</i>	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5	0,00
<i>Snx27</i>	Sorting nexin-27 isoform X1	0,00
<i>LOC101843174</i>	Component of the eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF-3) complex	0,00
<i>Atad1</i>	ATPase family AAA domain-containing protein 1	0,00
<i>Slc24a2</i>	Sodium/potassium/calcium exchanger 2 isoform X3	0,00
<i>Itm2c</i>	Integral Membrane Protein 2C	0,00
<i>Sdhc</i>	Succinate dehydrogenase cytochrome b560 subunit, mitochondrial	0,00
<i>Zer1</i>	Protein zer-1 homolog	0,00
<i>Oxsr1</i>	Oxidative Stress Responsive Kinase 1	0,00
<i>ND2</i>	NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Core Subunit 2	0,00
<i>LOC101842475</i>	Cytochrome b5-like; Belongs to the cytochrome b5 family	0,00

Proteínas diferencialmente expresadas identificadas por el método SSHOTGUN. Ratio IBQ control/GASH. En verde indica que son más abundantes (sobrexpresadas) y en rojo las que están en menor cantidad (infraexpresadas) que en el CI de los controles.

ANEXO 3- Listado de genes citados en el texto

Gen	Proteína	Gen	Proteína
<i>Abhd12</i>	Abhydrolase Domain Containing 12, Lysophospholipase	<i>Ank3</i>	ankyrin-3 isoform X26; Ankyrin-3 isoform X1
<i>Acaa1</i>	3-ketoacyl-CoA thiolase, peroxisomal	<i>Ankfy1</i>	Rabankyrin-5; Ankyrin repeat and FYVE domain-containing protein 1
<i>Acadslb</i>	Short/branched chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	<i>Anp32a</i>	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A isoform X1
<i>Acan</i>	Aggrecan core protein isoform x2	<i>Anxa4</i>	Annexin A4
<i>Acot13</i>	acyl-coenzyme A thioesterase 13	<i>Anxa6</i>	Annexin A6 isoform X1
<i>Acot13</i>	Acyl-coenzyme A thioesterase 13	<i>Anxa7</i>	Annexin A7 isoform X1
<i>Acox1</i>	isoform X2	<i>Ap1s1</i>	Subunit Sigma 1
<i>Acs11</i>	long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1 isoform X1	<i>Ap3m2</i>	AP-3 complex subunit mu-2
<i>Acs13</i>	long-chain-fatty-acid--CoA ligase 3-like isoform X1	<i>Apeh</i>	Acylamino-acid-releasing enzyme
<i>Acsm5</i>	Acyl-coenzyme A synthetase ACSM5, mitochondrial	<i>Apool</i>	Micos complex subunit
<i>Actr10</i>	Actin Related Protein 10	<i>Appl1</i>	DCC-interacting protein 13-alpha
<i>Acy1</i>	aminoacylase-1A-like isoform X1	<i>Arfgef3</i>	Brefeldin a-inhibited guanine nucleotide exchange protein 3 isoform x2
<i>Adgrg1</i>	G-protein coupled receptor 56	<i>Arhgap1</i>	Rho GTPase-activating protein 1
<i>Adprhl2</i>	Poly(adp-ribose) glycohydrolase arh3 isoform x1	<i>Arhgap44</i>	Rho gtpase-activating protein 44 isoform x3
<i>Adsl</i>	Adenylosuccinate lyase isoform X1	<i>Arl3</i>	ADP-ribosylation factor-like protein 3
<i>Adssl1</i>	Adenylosuccinate synthetase isozyme 1	<i>Arl6ip5</i>	PRA1 family protein 3
<i>Afg3l2</i>	AFG3-like protein 2	<i>Arpc3</i>	Actin Related Protein 2/3 Complex Subunit 3
<i>Afg3l2</i>	AFG3 Like Matrix AAA Peptidase Subunit 2	<i>Asl</i>	Argininosuccinate lyase-like isoform X1
<i>Agap3</i>	ArfGAP With GTPase Domain, Ankyrin Repeat And PH Domain 3	<i>Astn1</i>	Astrotactin-1 isoform X1
<i>Agpat1</i>	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase	<i>Atad1</i>	ATPase family AAA domain-containing protein 1
<i>Ahi1</i>	Joubertin isoform x3; Joubertin isoform X1; Joubertin	<i>Atcay</i>	Caytaxin
<i>Aimp1</i>	Aminoacyl trna synthase complex-interacting multifunctional protein 1 isoform x1	<i>Atg4b</i>	Cysteine protease required for the cytoplasm to vacuole transport (Cvt) and autophagy
<i>Aip</i>	AH receptor-interacting protein	<i>Atox1</i>	copper transport protein ATOX1 isoform X2
<i>Aip</i>	AH receptor-interacting protein	<i>Atox1</i>	Copper transport protein atox1 isoform x2
<i>Alcam</i>	CD166 antigen isoform X1	<i>Atp1a1</i>	Sodium/Potassium-Transporting ATPase Subunit Alpha-1
<i>Aldh18a1</i>	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase	<i>Atp2b3</i>	ATPase Plasma Membrane Ca2+ Transporting 3
<i>Aldh11l</i>	Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member L1	<i>Atp2b4</i>	plasma membrane calcium-transporting ATPase 4
<i>Aldh3a2</i>	Fatty aldehyde dehydrogenase	<i>Atp4a</i>	ATPase H+/K+ Transporting Subunit Alpha
<i>Ampd2</i>	AMP deaminase 2 isoform X1 Adenosine and AMP deaminases family	<i>Atp8a1</i>	Probable phospholipid-transporting ATPase 1A isoform X1;
<i>Anapc5</i>	anaphase-promoting complex subunit 5	<i>Atxn10</i>	Ataxin 10
<i>Ank3</i>	ankyrin-3 isoform X26; Ankyrin-3 isoform X1	<i>Baiap2</i>	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2 isoform X1
<i>Ankfy1</i>	Rabankyrin-5; Ankyrin repeat and FYVE domain-containing protein 1		

Gen	Proteína
<i>Cltb</i>	Clathrin light chain
<i>Clvs2</i>	Clavesin-2 isoform X2; Clavesin-2-like
<i>Clybl</i>	Citrate Lyase Subunit Beta-Like Protein, Mitochondrial
<i>Cmas</i>	N-acylneuraminate cytidyltransferase
<i>Cmpk2</i>	UMP-CMP kinase 2, mitochondrial
<i>Cmtm5</i>	CKLF-like MARVEL transmembrane domain-containing protein 5
<i>Cndp2</i>	Cytosolic non-specific dipeptidase isoform X1
<i>Cntn2</i>	contactin-2
<i>Coasy</i>	Bifunctional coenzyme A synthase
<i>Copa</i>	COPI Coat Complex Subunit Alpha
<i>Copb1</i>	Coatomer subunit beta
<i>Cotl1</i>	Coactosin-like protein
<i>Cpe</i>	Carboxypeptidase E
<i>Cplx2</i>	Complexin-2-like
<i>Cpm</i>	Carboxypeptidase M
<i>Cpne1</i>	Copine-1 isoform X2
<i>Cpne5</i>	Copine-5 isoform X2; Copine-5
<i>Crk</i>	Adapter molecule crk isoform X1
<i>Cryz</i>	Quinone oxidoreductase
<i>Csk</i>	Tyrosine-protein kinase
<i>Csrp1</i>	Cysteine and glycine-rich protein 1
<i>Cstb</i>	cystatin-B
<i>Ctnna1</i>	Catenin alpha-1 isoform X1
<i>Ctnna2</i>	Catenin alpha-2 isoform X1
<i>Ctnnd2</i>	Catenin Delta 2
<i>Cul1</i>	Cullin-1
<i>Cul2</i>	Cullin-2
<i>Cul5</i>	Cullin-5
<i>CUNH22orf46</i>	Uncharacterized protein c22orf46 homolog
<i>Cyfp1</i>	Cytoplasmic fmr1-interacting protein
<i>Cyth1</i>	Cytohesin-1 isoform X2; Cytohesin-1
<i>Dab2ip</i>	Disabled homolog 2-interacting protein isoform X1
<i>Dars2</i>	Aspartyl-TRNA Synthetase 2, Mitochondrial
<i>Dctn4</i>	Dynactin subunit 4 isoform X1
<i>Dcxr</i>	L-xylulose reductase;
<i>Ddah1</i>	Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase 1
<i>Ddah2</i>	Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase 2

Gen	Proteína
<i>Ddc</i>	aromatic-L-amino-acid decarboxylase isoform X1
<i>Decr1</i>	2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial
<i>Dhdh</i>	Trans-1,2-dihydrobenzene-1,2-diol dehydrogenase
<i>Dhrs7</i>	dehydrogenase/reductase SDR family member 7
<i>Dhtkd1</i>	2-oxoglutarate dehydrogenase E1
<i>Dlg1</i>	Disks Large Homolog 1
<i>Dmtn</i>	Dematin isoform X1
<i>Dmx12</i>	Dmx Like 2
<i>Dnah11</i>	Dynein heavy chain 11, axonemal
<i>Dnaja3</i>	Dnaj homolog subfamily a member 3, mitochondrial isoform x1
<i>Dnajb1</i>	dnaJ homolog subfamily B member 1
<i>Dnajc5</i>	dnaJ homolog subfamily C member 5 isoform X1
<i>Dpp3</i>	Dipeptidyl peptidase 3 isoform X1
<i>Dusp3</i>	Dual specificity protein phosphatase 3
<i>Dync1li1</i>	Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1 isoform X1
<i>Echdc2</i>	enoyl-CoA hydratase domain-containing protein 2, mitochondrial isoform X1
<i>Eci2</i>	Enoyl-CoA Delta Isomerase 2
<i>Ehbp1</i>	EH domain-binding protein 1 isoform X2
<i>Ehd1</i>	EH domain-containing protein 1
<i>Ehd4</i>	EH domain-containing protein 4
<i>Eif2s3</i>	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3-like isoform X1
<i>Eif3e</i>	Eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF-3) complex
<i>Eif4a1</i>	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4A1
<i>Elp3</i>	Elongator Acetyltransferase Complex Subunit 3
<i>Enah</i>	protein enabled homolog isoform X6, 7, 5, 4, 3, 2, 1
<i>Endod1</i>	Endonuclease domain-containing 1 protein
<i>Enoph1</i>	Enolase-Phosphatase 1
<i>Epb41</i>	Erythrocyte Membrane Protein Band 4.1
<i>Ephx1</i>	Epoxide Hydrolase 1
<i>Epm2aip1</i>	EPM2A-interacting protein 1
<i>Eps15</i>	Epidermal growth factor receptor substrate 15

Gen	Proteína	Gen	Proteína
<i>Erlin2</i>	Erlin-2	<i>Erlin2</i>	Erlin-2
<i>Esyt1</i>	Extended synaptotagmin-1	<i>Esyt1</i>	Extended synaptotagmin-1
<i>Esyt2</i>	Extended synaptotagmin-2	<i>Esyt2</i>	Extended synaptotagmin-2
<i>Etfdh</i>	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, mitochondrial	<i>Etfdh</i>	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, mitochondrial
<i>Ezr</i>	Ezrin	<i>Ezr</i>	Ezrin
<i>Fabp3</i>	Fatty-acid binding protein (FABP) family	<i>Fabp3</i>	Fatty-acid binding protein (FABP) family
<i>Faf2</i>	FAS-associated factor 2 isoform X1	<i>Faf2</i>	FAS-associated factor 2 isoform X1
<i>Fam49a</i>	Protein FAM49A	<i>Fam49a</i>	Protein FAM49A
<i>Farsa</i>	phenylalanine--tRNA ligase alpha subunit	<i>Farsa</i>	phenylalanine--tRNA ligase alpha subunit
<i>Farsb</i>	Phenylalanyl-TRNA Synthetase Subunit Beta	<i>Farsb</i>	Phenylalanyl-TRNA Synthetase Subunit Beta
<i>Fetub</i>	fetuin-B	<i>Fetub</i>	fetuin-B
<i>Fga</i>	Fibrinogen alpha chain	<i>Fga</i>	Fibrinogen alpha chain
<i>Fgb</i>	Fibrinogen beta chain	<i>Fgb</i>	Fibrinogen beta chain
<i>Fkbp2</i>	Peptidylprolyl isomerase; Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP2 isoform X1	<i>Fkbp2</i>	Peptidylprolyl isomerase; Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP2 isoform X1
<i>Fkbp8</i>	Peptidylprolyl isomerase 8	<i>Fkbp8</i>	Peptidylprolyl isomerase 8
<i>Fn3krp</i>	ketosamine-3-kinase	<i>Fn3krp</i>	ketosamine-3-kinase
<i>Fnta</i>	Farnesyltransferase, CAAX Box, Alpha	<i>Fnta</i>	Farnesyltransferase, CAAX Box, Alpha
<i>Fxr2</i>	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 2	<i>Fxr2</i>	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 2
<i>G3bp2</i>	Ras GTPase-activating protein-binding protein 2 isoform X1	<i>G3bp2</i>	Ras GTPase-activating protein-binding protein 2 isoform X1
<i>Gaa</i>	Lysosomal Alpha-Glucosidase	<i>Gaa</i>	Lysosomal Alpha-Glucosidase
<i>Gabrg2</i>	Gamma-aminobutyric acid receptor subunit gamma-2	<i>Gabrg2</i>	Gamma-aminobutyric acid receptor subunit gamma-2
<i>Gale</i>	Udp-glucose 4-epimerase	<i>Gale</i>	Udp-glucose 4-epimerase
<i>Galk1</i>	Galactokinase	<i>Galk1</i>	Galactokinase
<i>Ganab</i>	Neutral alpha-glucosidase AB isoform X1	<i>Ganab</i>	Neutral alpha-glucosidase AB isoform X1
<i>Gapdh</i>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like	<i>Gapdh</i>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like
<i>Gbe1</i>	1,4-alpha-glucan-branching enzyme-like	<i>Gbe1</i>	1,4-alpha-glucan-branching enzyme-like
<i>Gcat</i>	2-Amino-3-Ketobutyrate Coenzyme A Ligase, Mitochondrial	<i>Gcat</i>	2-Amino-3-Ketobutyrate Coenzyme A Ligase, Mitochondrial
<i>Gdap11l</i>	Ganglioside Induced Differentiation Associated Protein 1 Like 1	<i>Gdap11l</i>	Ganglioside Induced Differentiation Associated Protein 1 Like 1
<i>Get4</i>	Golgi to ER traffic protein 4 homolog	<i>Get4</i>	Golgi to ER traffic protein 4 homolog
<i>Gfap</i>	Glial fibrillary acidic protein	<i>Gfap</i>	Glial fibrillary acidic protein
<i>Gfm1</i>	Elongation factor g, mitochondrial 1	<i>Gfm1</i>	Elongation factor g, mitochondrial 1
<i>Ggal</i>	ADP-ribosylation factor-binding protein GGA1	<i>Ggal</i>	ADP-ribosylation factor-binding protein GGA1
<i>Git1</i>	ARF GTPase-activating protein GIT1 isoform X1	<i>Git1</i>	ARF GTPase-activating protein GIT1 isoform X1
<i>Gjc3</i>	Gap junction protein	<i>Gjc3</i>	Gap junction protein
<i>Gk</i>	Glycerol kinase isoform x3; Glycerol kinase isoform X1	<i>Gk</i>	Glycerol kinase isoform x3; Glycerol kinase isoform X1
<i>Glg1</i>	Golgi apparatus protein 1 isoform X1	<i>Glg1</i>	Golgi apparatus protein 1 isoform X1
		<i>Gmpr</i>	Gmp reductase

Gen	Proteína	Gen	Proteína
<i>Gnat1</i>	Guanine nucleotide-binding protein G(t) subunit alpha-1	<i>Ilf2</i>	Interleukin enhancer-binding factor 2 isoform X1
<i>Gng4</i>	Aspartyl-TRNA Synthetase 2, Mitochondrial	<i>Ilk</i>	Integrin-linked protein kinase isoform X1
<i>GNPDA1</i>	Glucosamine-6-phosphate isomerase 1	<i>Ipo4</i>	Importin-4
<i>Golga7</i>	Golgin subfamily A member 7	<i>Isoc2a</i>	isochorismatase domain-containing protein 2A
<i>Golph3</i>	Golgi phosphoprotein 3 isoform x1; Golgi phosphoprotein 3	<i>Itm2c</i>	Integral Membrane Protein 2C
<i>Grhpr</i>	Glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase isoform X1	<i>Jup</i>	Junction plakoglobin
<i>Gria2</i>	Glutamate receptor 2 isoform X1	<i>Kcnj10</i>	Atp-sensitive inward rectifier potassium channel 10 isoform x1
<i>Gria3</i>	Glutamate receptor 3 isoform X4	<i>Kcnk5</i>	Potassium channel subfamily K member 5
<i>Gria4</i>	Glutamate receptor 4 isoform X1	<i>Kctd12</i>	BTB/POZ domain-containing protein KCTD12
<i>Gripap1</i>	GRIP1-associated protein 1 isoform X1	<i>Kctd14</i>	BTB/POZ domain-containing protein KCTD14
<i>GRK2</i>	G Protein-Coupled Receptor Kinase 2		RAB11 Binding And LisH Domain, Coiled-Coil And HEAT Repeat Containing
<i>Gsn</i>	Gelsolin isoform X1	<i>Kiaa1468</i>	
<i>Guk1</i>	Guanylate kinase isoform X1	<i>Kif1a</i>	Kinesin-like protein KIF1A isoform X1
<i>H1-2</i>	histone H1.2	<i>Klc2</i>	Kinesin light chain 2 isoform X1
<i>H1-4</i>	histone H1.4	<i>Klc4</i>	Kinesin light chain 4
<i>Hacd3</i>	3-Hydroxyacyl-CoA Dehydratase 3	<i>Kyat1</i>	Kynurenine--oxoglutarate transaminase 1 isoform x3
<i>Hars</i>	histidine--tRNA ligase, cytoplasmic	<i>L1cam</i>	Neural cell adhesion molecule L1 isoform X1
<i>Hddc2</i>	Hd domain-containing protein 2 isoform x1; HD domain-containing protein 2	<i>Lamb2</i>	Laminin Subunit Beta-2
<i>Hdgf</i>	Hepatoma-derived growth factor isoform X1	<i>Lars</i>	Leucyl-TRNA Synthetase 1
<i>Hebp1</i>	Heme-binding protein 1	<i>Lcp1</i>	Plastin-2
<i>Hexb</i>	Beta-hexosaminidase subunit beta	<i>Lgals1</i>	Galectin
<i>Hint1</i>	histidine triad nucleotide-binding protein 1	<i>Lin7a</i>	Protein lin-7 homolog
<i>Hint2</i>	Histidine Triad Nucleotide-Binding Protein 2, Mitochondrial	<i>LOC101823829</i>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like
<i>Hmgb2</i>	High mobility group protein B2	<i>LOC101824618</i>	NADH-cytochrome b5 reductase 1-like
<i>Hmgcs1</i>	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase	<i>LOC101825928</i>	Histone h4
<i>Hmox2</i>	Heme oxygenase 2	<i>LOC101826350</i>	Polyadenylate-binding protein; Binds the poly(A) tail of mRNA
<i>Hnrnpa1</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 isoform X1	<i>LOC101828166</i>	Dehydrogenase/reductase SDR family member 7-like
<i>HSD11B1</i>	Corticosteroid 11-beta-dehydrogenase isozyme 1	<i>LOC101829167</i>	cystatin-C-like
<i>Hsd17b8</i>	Estradiol 17-beta-dehydrogenase 8	<i>LOC101830140</i>	40S ribosomal protein S21-like
<i>Hsd11</i>	Inactive hydroxysteroid dehydrogenase-like protein 1	<i>LOC101830493</i>	uncharacterized protein LOC101830493
<i>Hspg2</i>	Basement Membrane-Specific Heparan Sulfate Proteoglycan Core Protein	<i>LOC101830505</i>	ADP-ribosylation factor 2
<i>Htra2</i>	Serine protease HTRA2, mitochondrial isoform X1	<i>LOC101831032</i>	Vacuolar protein sorting-associated protein 4B-like
<i>Htt</i>	Huntingtin	<i>LOC101833108</i>	Dehydrogenase/reductase SDR family member 4
<i>Hyi</i>	Putative hydroxypyruvate isomerase	<i>LOC101833678</i>	Hemoglobin subunit beta-like
<i>Ide</i>	Insulin-degrading enzyme	<i>LOC101834751</i>	methionine--tRNA ligase, cytoplasmic

Gen	Proteína	Gen	Proteína
<i>LOC101834965</i>	hydroxymethylglutaryl-CoA lyase, mitochondrial-like	<i>Maip1</i>	M-aaa protease-interacting protein 1, mitochondrial; Uncharacterized protein C2orf47 homolog, mitochondrial
<i>LOC101835570</i>	Cholesterol 24-hydroxylase-like isoform X1	<i>Map4</i>	Microtubule-associated protein 4
<i>LOC101836740</i>	uncharacterized protein C2orf47 homolog, mitochondrial	<i>Mapk8</i>	Mitogen-activated protein kinase 8 isoform X3
<i>LOC101836945</i>	Oxysterol-binding protein-related protein 1	<i>Mapre3</i>	Microtubule-associated protein RP/EB family member 3 isoform X1
<i>LOC101837465</i>	contactin-associated protein-like 2	<i>Mat2a</i>	S-Adenosylmethionine Synthase Isoform Type-2
<i>LOC101838460</i>	Protein transport protein Sec31A-like isochorismatase domain-containing	<i>Matr3</i>	Matrin-3-like isoform X1
<i>LOC101839073</i>	protein 2A, mitochondrial-like	<i>Mblac2</i>	Metallo-beta-lactamase domain-containing protein 2 isoform x1
<i>LOC101839254</i>	Solute carrier family 2	<i>Mbp</i>	Myelin basic protein S isoform X1
<i>LOC101839336</i>	Isochorismatase domain-containing protein 2B, mitochondrial-like	<i>Mccc1</i>	methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha, mitochondrial
<i>LOC101840630</i>	neurofilament light polypeptide-like	<i>Mcu</i>	Calcium uniporter protein, mitochondrial isoform X1
<i>LOC101841805</i>	cytochrome c oxidase subunit 7A2, mitochondrial	<i>Mgll</i>	LOW QUALITY PROTEIN: monoglyceride lipase
<i>LOC101841832</i>	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type 1D	<i>Micu3</i>	calcium uptake protein 3, mitochondrial
<i>LOC101841963</i>	Gmp synthase [glutamine-hydrolyzing] isoform x2	<i>Miga2</i>	Mitoguardin 2 isoform x1
<i>LOC101842058</i>	Cytochrome c, somatic-like	<i>Mlycd</i>	malonyl-CoA decarboxylase, mitochondrial
<i>LOC101842475</i>	Cytochrome b5-like; Belongs to the cytochrome b5 family	<i>Mobp</i>	Myelin-Associated Oligodendrocyte Basic Protein
<i>LOC101843100</i>	Glutathione s-transferase omega-1-like isoform x1	<i>Mon2</i>	Protein MON2 homolog
<i>LOC101843174</i>	Component of the eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF-3) complex	<i>Mpp1</i>	55 kDa erythrocyte membrane protein isoform X1
<i>LOC101843256</i>	Histone H2B	<i>Mpst</i>	Mercaptopyruvate Sulfurtransferase
<i>LOC101843673</i>	Mitochondrial chaperone bcs1 isoform x1	<i>Mpst</i>	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase
<i>LOC101843823</i>	Alpha-1-inhibitor 3-like	<i>Mrps27</i>	28S ribosomal protein S27, mitochondrial
<i>LOC101844122</i>	Nadh dehydrogenase [ubiquinone] 1 subunit c2	<i>Msi2</i>	RNA-binding protein Musashi homolog 2 isoform X1
<i>LOC101844224</i>	Myosin regulatory light chain RLC-A isoform X1	<i>Mtap</i>	Methylthioadenosine Phosphorylase
<i>LOC101844314</i>	60S ribosomal protein L13-like isoform X3, X2, X1	<i>Mtfr11</i>	Mitochondrial Fission Regulator 1-Like
<i>LOC101844912</i>	PRAME family member 12-like	<i>Mtor</i>	Serine/threonine-protein kinase mtor
<i>LOC106021941</i>	serine/threonine-protein kinase DCLK2-like	<i>Mtx3</i>	Metaxin-3 isoform X1; LOW QUALITY PROTEIN: metaxin-3
<i>LOC106022755</i>	Serine/threonine-protein kinase dclk2-like isoform x2	<i>Mut</i>	methylmalonyl-CoA mutase, mitochondrial
<i>LOC106022906</i>	cytosolic purine 5'-nucleotidase-like	<i>Mvp</i>	Major vault protein isoform X1
<i>LOC106023045</i>	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP], mitochondrial	<i>Myh10</i>	Myosin-10
<i>LOC110342274</i>	Hydroxyacyl-thioester dehydratase type 2, mitochondrial-like	<i>Myh9</i>	Myosin-9
<i>LOC110342531</i>	dynamin-2-like	<i>Myo18a</i>	Unconventional myosin-XVIIIa isoform X1
<i>LOC110343394</i>	F-box only protein 44 isoform X1	<i>Myo1d</i>	Unconventional myosin-id isoform x1
<i>Ly6h</i>	Lymphocyte antigen 6H isoform X1	<i>Mypn</i>	Myopalladin isoform x2; Myopalladin isoform X1
<i>Lypla2</i>	Acyl-protein thioesterase 2	<i>Nap111</i>	Nucleosome assembly protein 1-like 1 isoform X3
<i>Lymr4</i>	LYR Motif-Containing Protein 4	<i>Nckap1</i>	Nck-associated protein 1 isoform X1
<i>Macf1</i>	Microtubule-actin cross-linking factor 1, isoforms 1/2/3/5 isoform X1	<i>Ncs1</i>	Neuronal Calcium Sensor 1
		<i>ND1</i>	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1

Gen	Proteína
<i>ND2</i>	NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Core Subunit 2
<i>ND5</i>	NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Core Subunit 5
<i>Ndrp1</i>	Protein NDRG1
<i>Ndrp2</i>	Protein ndr2 isoform x2
<i>Ndrp4</i>	Protein ndr4 isoform x1
<i>Ndufa4</i>	Cytochrome c oxidase subunit NDUFA4
<i>Ndufa5</i>	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 5
<i>Ndufb1</i>	Nadh dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 1
<i>Ndufb6</i>	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 6 isoform X1
<i>NDUFC2</i>	NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Subunit C2
<i>Ndufs4</i>	NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Subunit S4
<i>NDUFS8</i>	NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Subunit S8
<i>Nefh</i>	Neurofilament heavy polypeptide
<i>Nefm</i>	Neurofilament medium polypeptide
<i>Ngb</i>	Neuroglobin
<i>Nit2</i>	Omega-amidase NIT2
<i>Nlgn1</i>	Neuroigin-1 isoform X1
<i>Nln</i>	Neurolysin, mitochondrial
<i>Nme3</i>	Nucleoside diphosphate kinase 3 isoform X2
<i>Nnt</i>	NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial
<i>Nono</i>	non-POU domain-containing octamer-binding protein
<i>Nos1</i>	Nitric oxide synthase; Produces nitric oxide (NO)
<i>Nova1</i>	RNA-binding protein Nova-1-like
<i>Nrxn3</i>	Neurexin 3 isoform x12; Neurexin-3-beta isoform X1
<i>Nt5c</i>	5'(3')-deoxyribonucleotidase, cytosolic type
<i>Nudt2</i>	Bis(5'-nucleosyl)-tetrphosphatase [asymmetrical]
<i>Nudt21</i>	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5
<i>Numb</i>	protein numb homolog isoform X4, 3, 2, 1
<i>Ogt</i>	O-Linked N-Acetylglucosamine (GlcNAc) Transferase
<i>Ola1</i>	Obg-like atpase 1
<i>Omg</i>	Oligodendrocyte-myelin glycoprotein
<i>Osbp</i>	Oxysterol-binding protein 1
<i>Osbpl2</i>	Oxysterol-binding protein-related protein 2 isoform X1
<i>Oscp1</i>	Protein oscp1 isoform x2; Protein OSCP1-like
<i>Oxsr1</i>	Oxidative Stress Responsive Kinase 1
<i>Pacsin2</i>	Protein Kinase C And Casein Kinase Substrate In Neurons 2

Gen	Proteína
<i>Padi2</i>	Protein-arginine deiminase type-2
<i>Paics</i>	Phosphoribosylaminoimidazole Carboxylase And Phosphoribosylaminoimidazolesuccinocarboxamide Synthase
<i>Pak1</i>	Serine/threonine-protein kinase PAK 1
<i>Palm</i>	Paralemmin-1
<i>Pbxip1</i>	Pre-b-cell leukemia transcription factor-interacting protein 1 isoform x5
<i>Pcbp2</i>	poly(rC)-binding protein 2 isoform X1
<i>Pcca</i>	propionyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial
<i>Pck2</i>	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP], mitochondrial
<i>Pcsk1n</i>	proSAAS
<i>Pcyox1</i>	Prenylcysteine oxidase 1
<i>Pcyox1l</i>	Prenylcysteine oxidase-like
<i>Pdcd6</i>	Programmed cell death protein 6 isoform X1
<i>Pdia4</i>	Protein disulfide-isomerase A4
<i>Pdp1</i>	Pyruvate dehydrogenase phosphatase catalytic subunit 1 isoform X3, X2, X3
<i>Pex5l</i>	PEX5-related protein isoform X3; PEX5-related protein isoform X1
<i>Pfas</i>	Phosphoribosylformylglycinamidine synthase
<i>Pfkl</i>	ATP-Dependent 6-Phosphofructokinase, Liver Type
<i>Pgk2</i>	Phosphoglycerate kinase 2
<i>Pgm2l1</i>	Glucose 1,6-bisphosphate synthase
<i>Pgrmc2</i>	Membrane-associated progesterone receptor component 2
<i>Phpt1</i>	14 kDa phosphohistidine phosphatase
<i>Pi4ka</i>	Phosphatidylinositol 4-kinase alpha
<i>Pip4k2c</i>	Phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase type-2 gamma isoform X1
<i>Pitpnb</i>	Phosphatidylinositol transfer protein beta isoform isoform X2, X1
<i>Pitpnm1</i>	Membrane-associated phosphatidylinositol transfer protein 1
<i>Pitrm1</i>	Presequence protease, mitochondrial isoform X2
<i>Plcd1</i>	Phosphoinositide phospholipase C1
<i>Plcl1</i>	Phosphoinositide phospholipase c; Inactive phospholipase C-like protein 1
<i>Plin3</i>	Perilipin-3
<i>Plip</i>	Plasmolipin
<i>PLP1</i>	Proteolipid Protein 1
<i>Pop1</i>	ribonucleases P/MRP protein subunit POP1
<i>Ppid</i>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D
<i>Ppm1b</i>	Protein Phosphatase 1B
<i>Ppm1e</i>	Protein phosphatase 1E
<i>Ppp1ca</i>	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit isoform X1
<i>Ppp1cb</i>	Protein Phosphatase 1 Catalytic Subunit Beta

Gen	Proteína
<i>Ppp2r5c</i>	Protein Phosphatase 2 Regulatory Subunit B'Gamma
<i>Ppp2r5d</i>	Serine/threonine-protein phosphatase 2a 56 kda regulatory subunit.
<i>PPP3CA</i>	Protein Phosphatase 3 Catalytic Subunit Alpha
<i>Ppp3r1</i>	calcineurin subunit B type 1
<i>PPP3R1</i>	
<i>Ppp6c</i>	Serine/threonine-protein phosphatase 6 catalytic subunit isoform X1
<i>Prdx4</i>	Peroxiredoxin-4
<i>Prkar1a</i>	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit
<i>Prkar1b</i>	cAMP-dependent protein kinase type I-beta regulatory subunit
<i>Prkcsb</i>	Glucosidase 2 Subunit Beta
<i>Prkra</i>	Protein Activator Of Interferon Induced Protein Kinase EIF2AK2
<i>Prmt5</i>	Protein arginine N-methyltransferase 5-like
<i>Prrt2</i>	Proline-rich transmembrane protein 2
<i>Prune1</i>	Exopolyphosphatase prune1; Protein prune homolog
<i>Psip1</i>	PC4 and SFRS1-interacting protein isoform X2, 1
<i>Psmb3</i>	Proteasome 20S Subunit Beta 3
<i>Psmb4</i>	Proteasome subunit beta
<i>Psmb7</i>	Proteasome subunit beta type-7
<i>Psmc1</i>	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1 isoform X1
<i>Psmc5</i>	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 5 isoform X1
<i>Psmc8</i>	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8
<i>Psph</i>	Phosphoserine Phosphatase
<i>Ptbp2</i>	Polypyrimidine tract-binding protein 2 isoform X1
<i>Ptgr2</i>	prostaglandin-E(2) 9-reductase-like isoform X1
<i>Ptp4a1</i>	Protein tyrosine phosphatase type IVA 1 isoform X1
<i>Ptpn9</i>	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 9
<i>Ptprn2</i>	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase N2-like
<i>Ptprs</i>	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase S
<i>Ptprz1</i>	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase zeta isoform X1
<i>Puf60</i>	Poly(u)-binding-splicing factor puf60 isoform x1
<i>Rab11fip5</i>	Rab11 family-interacting protein 5 isoform X1
<i>Rab12</i>	Ras-related protein Rab-12
<i>Rab22a</i>	Ras-related protein rab-22a isoform x3; Ras-related protein Rab-22A

Gen	Proteína
<i>Rab27b; Rab27a</i>	ras-related protein Rab-27B; ras-related protein Rab-27A
<i>RAB3B</i>	Ras-related protein Rab-3B
<i>Rab4a</i>	Ras-related protein Rab-4A isoform X1
<i>Rab6a</i>	RAB6A-GEF complex partner protein 2 isoform X3
<i>Rab8a</i>	RAB8A, Member RAS Oncogene Family
<i>Rab9b</i>	Ras-related protein Rab-9B
<i>Rabgap1</i>	Rab gtpase-activating protein 1
<i>Rabggta</i>	Geranylgeranyl transferase type-2 subunit alpha
<i>Rac3</i>	Ras-related c3 botulinum toxin substrate 3 isoform x1;
<i>Rad23b</i>	UV excision repair protein RAD23 homolog B
<i>Rap1gap</i>	Rap1 GTPase-activating protein 1 isoform X1
<i>Rasgrp2</i>	RAS guanyl-releasing protein 2 isoform X1
<i>Rdx</i>	Radixin
<i>Reep5</i>	Receptor expression-enhancing protein 5
<i>Rgs6</i>	Regulator of G-protein signaling 6 isoform x3
<i>Rheb</i>	GTP-binding protein Rheb
<i>Ric8a</i>	synembryn-A isoform X1
<i>Rnmt</i>	mRNA cap guanine-N7 methyltransferase
<i>Rogdi</i>	Protein rogdi homolog isoform x1
<i>Rpl12</i>	60S ribosomal protein L12 isoform X1
<i>Rpl23</i>	60S ribosomal protein L23
<i>Rpl23a</i>	60S ribosomal protein L23a
<i>Rpl27</i>	60S ribosomal protein L27
<i>Rpl9</i>	60S ribosomal protein L9
<i>Rpn2</i>	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2
<i>Rps12</i>	40S ribosomal protein S12
<i>RPS24</i>	40S ribosomal protein S24
<i>Rps29</i>	40S ribosomal protein S29
<i>Rps5</i>	40S ribosomal protein S5-like
<i>Rptor</i>	Regulatory-associated protein of mTOR
<i>Rragd</i>	Ras-related gtp-binding protein d isoform x1
<i>Rtn3</i>	Reticulon-3
<i>Rtn4ip1</i>	reticulon-4-interacting protein 1, mitochondrial isoform X1
<i>Ruvbl1</i>	RuvB Like AAA ATPase 1
<i>S100a1</i>	Protein S100-A1
<i>S100b</i>	Protein S100-B
<i>Sacm1l</i>	Phosphatidylinositolide phosphatase SAC1

Gen	Proteína
<i>Sar1a</i>	GTP-binding protein SAR1a
<i>Sarm1</i>	Sterile alpha and TIR motif-containing protein 1
<i>Scamp1</i>	Secretory Carrier Membrane Protein 1
<i>Scarb2</i>	Scavenger receptor class B member 2
<i>Scfd2</i>	Sec1 family domain-containing protein 2 isoform X1
<i>Scpep1</i>	Carboxypeptidase; Retinoid-inducible serine carboxypeptidase
<i>Sdhc</i>	Succinate dehydrogenase cytochrome b560 subunit, mitochondrial
<i>Sec22b</i>	Vesicle-trafficking protein SEC22b-like
<i>Sec24c</i>	Protein transport protein Sec24C
<i>Sept5</i>	Septin-5 isoform X2
<i>Sept9</i>	Septin-9 isoform X1
<i>Serpina1</i>	Serpin Family A Member 1
<i>Serpinb8</i>	Serpin B8
<i>Sgip1</i>	SH3-containing GRB2-like protein 3-interacting protein 1 isoform X1
<i>Sgtb</i>	Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein beta
<i>Sh3bgrl</i>	SH3 Domain Binding Glutamate Rich Protein Like
<i>Sh3gl3</i>	Endophilin-A3
<i>Sirpa</i>	Tyrosine-Protein Phosphatase Non-Receptor Type Substrate 1
<i>Sirt5</i>	Nad-dependent protein deacylase sirtuin-5, mitochondrial
<i>Slc12a2</i>	Solute carrier family 12 member 2 isoform X1
<i>Slc12a6</i>	Solute carrier family 12 member 6 isoform X1
<i>Slc17a6</i>	Vesicular glutamate transporter 2 isoform x1
<i>Slc24a2</i>	Sodium/potassium/calcium exchanger 2 isoform X3
<i>Slc25a25</i>	Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-2 isoform X2
<i>Slc27a4</i>	Long-Chain Fatty Acid Transport Protein 4
<i>Slc4a1</i>	Solute Carrier Family 4 Member 1
<i>Slc4a10</i>	Sodium-driven chloride bicarbonate exchanger isoform X1
<i>Slc6a17</i>	Sodium-dependent neutral amino acid transporter SLC6A17
<i>Slc6a5</i>	Sodium- and chloride-dependent glycine transporter 2
<i>Slirp</i>	SRA stem-loop-interacting RNA-binding protein, mitochondrial
<i>Smcr8</i>	Smith-Magenis syndrome chromosomal region candidate gene 8 protein
<i>SNAP25</i>	Synaptosome Associated Protein 25
<i>Sncg</i>	Gamma-synuclein

Gen	Proteína
<i>Snx2</i>	sorting nexin-2
<i>Snx27</i>	Sorting nexin-27 isoform X1
<i>Spag9</i>	Sperm Associated Antigen 9
<i>Sparcl1</i>	SPARC-like protein 1
<i>Sptb</i>	Spectrin Beta, Erythrocytic
<i>Sptbn4</i>	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 4 isoform X1
<i>Srcin1</i>	Src kinase signaling inhibitor 1 isoform x13
<i>Srp72</i>	Signal recognition particle subunit srp72
<i>Srr</i>	Serine racemase isoform X1
<i>Srsf1</i>	Serine/arginine-rich splicing factor 1
<i>Srsf2</i>	Serine/arginine-rich splicing factor 2 isoform X1
<i>Srsf5</i>	Serine/arginine-rich splicing factor 5 isoform X1
<i>Ssb</i>	Lupus La protein homolog
<i>Ssr1</i>	translocon-associated protein subunit alpha isoform X2, 1
<i>Stoml2</i>	Stomatin-Like Protein 2, Mitochondrial
<i>Strn</i>	Striatin
<i>Strn4</i>	Striatin-4 isoform X1
<i>Stub1</i>	E3 ubiquitin-protein ligase CHIP
<i>Stx12</i>	Syntaxin-12
<i>Stx4</i>	syntaxin-4 isoform X2, 1
<i>Stxbp3</i>	Syntaxin-binding protein 3
<i>Stxbp6</i>	Syntaxin-binding protein 6
<i>Sub1</i>	Activated RNA Polymerase II Transcriptional Coactivator P15
<i>Sv2b</i>	synaptic vesicle glycoprotein 2B
<i>Sv2b</i>	Synaptic vesicle glycoprotein 2B-like
<i>Sv2c</i>	Synaptic vesicle glycoprotein 2C
<i>Syn3</i>	synapsin-3 isoform X1, 2
<i>Synj2bp</i>	Synaptojanin-2-binding protein
<i>Syt7</i>	Synaptotagmin 7
<i>TARS3</i>	Threonyl-TRNA Synthetase 3
<i>Tarsl2</i>	Probable threonine--tRNA ligase 2, cytoplasmic
<i>Tbcd</i>	Tubulin-specific chaperone D
<i>Tbce</i>	Tubulin-specific chaperone E isoform X1
<i>Tbrg4</i>	Protein TBRG4 isoform X1
<i>Tecr</i>	Very-long-chain enoyl-CoA reductase isoform X1
<i>Tfg</i>	Protein TFG
<i>Tfrc</i>	Transferrin receptor protein 1
<i>Thop1</i>	Thimet oligopeptidase
<i>Thumpd1</i>	THUMP domain-containing protein 1

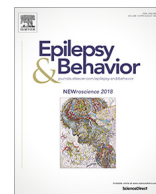
Gen	Proteína
<i>Tmed2</i>	Transmembrane emp24 domain-containing protein 2
<i>Tmed9</i>	Transmembrane emp24 domain-containing protein 9
<i>Tmem65</i>	Transmembrane protein 65
<i>Tmx2</i>	protein 2 isoform X1
<i>Tmx3</i>	Protein disulfide-isomerase TMX3-like
<i>Tmx4</i>	Thioredoxin-related transmembrane protein 4
<i>Tom1</i>	Target of myb protein 1 isoform x2
<i>Tomm40l</i>	mitochondrial import receptor subunit TOM40B
<i>Tp53bp1</i>	TP53-binding protein 1 isoform X1
<i>Tpbg</i>	Trophoblast glycoprotein isoform X1
<i>Tpm4</i>	Tropomyosin alpha-4 chain isoform x2
<i>Tpmt</i>	thiopurine S-methyltransferase
<i>Tpp2</i>	Tripeptidyl-peptidase 2
<i>Trappc6b</i>	Trafficking protein particle complex subunit 6B
<i>Trio</i>	triple functional domain protein
<i>Tspyl4</i>	Testis-specific Y-encoded-like protein 4
<i>Tstd3</i>	Thiosulfate sulfurtransferase/rhodanese-like domain-containing protein 3
<i>Ttc7b</i>	Tetratricopeptide repeat protein 7b isoform x2
<i>Ttl5</i>	Tubulin Polyglutamylase TTL5
<i>Ttr</i>	Transthyretin
<i>Ttyh3</i>	Protein tweety homolog; Probable chloride channel
<i>Tuba8</i>	Tubulin Alpha 8
<i>Tubb6</i>	Tubulin Beta 6 Class V
<i>Txndc5</i>	thioredoxin domain-containing protein 5
<i>Txn1l</i>	Thioredoxin-like protein 1 isoform x1; Thioredoxin-like protein 1
<i>U2af1l4</i>	Splicing factor U2AF 26 kDa subunit isoform X1
<i>U2af2</i>	U2 snRNP auxiliary factor large subunit

Gen	Proteína
<i>Uba3</i>	Regulatory subunit of the dimeric UBA3-NAE1 E1 enzyme
<i>Ube2d1</i>	Ubiquitin-conjugating enzyme e2 d1 isoform x1
<i>Ube2k</i>	Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 K
<i>Ube2o</i>	Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 O
<i>Ube4b</i>	Ubiquitin conjugation factor E4 B isoform X1
<i>Ubqln2</i>	Ubiquilin-2
<i>Ubxn6</i>	UBX domain-containing protein 6
<i>Ubxn6</i>	Ubx domain-containing protein 6 isoform x1
<i>Ufd1</i>	Ubiquitin recognition factor in er-associated degradation protein 1 isoform x1
<i>Upf1</i>	Regulator of nonsense transcripts 1 isoform x4
<i>Usp9x</i>	Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase faf-x isoform x2
<i>Vamp3</i>	Vesicle-Associated Membrane Protein 3
<i>Vars</i>	Valyl-TRNA Synthetase
<i>VAR51</i>	Valyl-TRNA Synthetase 1
<i>Vbp1</i>	Prefoldin subunit 3
<i>Vcl</i>	Vinculin isoform X1
<i>Vgf</i>	Neurosecretory protein VGF
<i>VGF</i>	VGF Nerve Growth Factor Inducible
<i>Vma21</i>	Vacuolar atpase assembly integral membrane protein vma21
<i>Vps4a</i>	vacuolar protein sorting-associated protein 4A
<i>VPS4B</i>	vacuolar protein sorting-associated protein 4B
<i>Vps51</i>	Vacuolar protein sorting-associated protein 51 homolog
<i>Vps53</i>	Vacuolar protein sorting-associated protein 53 homolog isoform X1
<i>Wasf3</i>	Wiskott-aldrich syndrome protein family member 3 isoform x1
<i>Wdr47</i>	WD repeat-containing protein 47 isoform X4, 3, 2, 1
<i>Xpo7</i>	Low quality protein: exportin-7; Exportin-7 isoform X1
<i>Zer1</i>	Protein zer-1 homolog



Contents lists available at ScienceDirect

Epilepsy & Behavior

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yebeh

Molecular tools for the characterization of seizure susceptibility in genetic rodent models of epilepsy

José Ramón Bosque^{a,b}, Ricardo Gómez-Nieto^{a,b,c}, Sebastián Hormigo^{a,d}, M.Javier Herrero-Turrión^{a,e}, Elena Díaz-Casado^{a,b}, Consuelo Sancho^{a,b}, Dolores E. López^{a,b,c,*}

^a Institute for Neuroscience of Castilla y León (INCyL), University of Salamanca, Salamanca, Spain

^b Salamanca Institute for Biomedical Research (IBSAL), Spain

^c Department of Cell Biology and Pathology, School of Medicine, University of Salamanca, Salamanca, Spain

^d Department of Neurobiology and Anatomy, Drexel University College of Medicine, United States of America

^e INCyL Neurological Tissue Bank (BTN-INCyL), Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 August 2019

Revised 20 September 2019

Accepted 25 September 2019

Available online 1 November 2019

Keywords:

DNA analysis

Gene expression studies

Immunodetection

Post-translational protein modifications

Proteomic

ABSTRACT

Epilepsy is a chronic neurological disorder characterized by abnormal neuronal activity that arises from imbalances between excitatory and inhibitory synapses, which are highly correlated to functional and structural changes in specific brain regions. The difference between the normal and the epileptic brain may harbor genetic alterations, gene expression changes, and/or protein alterations in the epileptogenic nucleus. It is becoming increasingly clear that such differences contribute to the development of distinct epilepsy phenotypes. The current major challenges in epilepsy research include understanding the disease progression and clarifying epilepsy classifications by searching for novel molecular biomarkers. Thus, the application of molecular techniques to carry out comprehensive studies at deoxyribonucleic acid, messenger ribonucleic acid, and protein levels is of utmost importance to elucidate molecular dysregulations in the epileptic brain. The present review focused on the great diversity of technical approaches available and new research methodology, which are already being used to study molecular alterations underlying epilepsy. We have grouped the different techniques according to each step in the flow of information from DNA to RNA to proteins, and illustrated with specific examples in animal models of epilepsy, some of which are our own. Separately and collectively, the genomic and proteomic techniques, each with its own strengths and limitations, provide valuable information on molecular mechanisms underlying seizure susceptibility and regulation of neuronal excitability. Determining the molecular differences between genetic rodent models of epilepsy and their wild-type counterparts might be a key in determining mechanisms of seizure susceptibility and epileptogenesis as well as the discovery and development of novel antiepileptic agents.

This article is part of the Special Issue “NEWroscience 2018”

© 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

Abbreviations: 2D-DIGE, 2D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis; aCGH, array comparative genomic hybridization; AcsM3, coenzyme acyl-CoA synthetase; ATP5H, ATP synthase subunit d, mitochondrial protein; *C1q*, complement C1q chain; *Camk2*, calcium/calmodulin-dependent protein kinase 2; CDKL5, cyclin-dependent kinase like 5; cDNA, complementary DNA; CGH, comparative genomic hybridization; ChIP-Seq, chromatin immunoprecipitation sequencing; CNVs, copy number variations; CSF, cerebrospinal fluid; *Egr1,2,3*, early growth response protein 1, 2 or 3; EWCE, expression-weighted cell-type enrichment; FISSEQ, fluorescent in situ RNA sequencing; *FN1*, encodes fibronectin; GABA(A)R, GABA_A receptor; GAERS, Genetic Absence Epilepsy Rat from Strasbourg; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GASH/Sal, genetic audiogenic seizure hamster from Salamanca; GFAP, glial fibrillary acidic protein; *Gpr126*, G-protein coupled receptor 126; *Gria2*, glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2; *Grin2a*, glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2A; H3/H4, histone H3/H4; HDAC, histone deacetylase; HIF-1, hypoxia inducible factor 1; HPLC, high-performance liquid chromatography; *Il10rb*, interleukin 10 receptor subunit beta; IC, inferior colliculus; iTRAQ, isobaric tags for a relative and absolute quantification; JAK/STAT signaling pathway, Janus kinases (JAK)/signal transducer and activator of transcription proteins (STATs); *KIF5A*, kinesin heavy chain isoform 5A; LCM, laser capture microdissection; MALDI, matrix-assisted laser desorption/ionization; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MDH1, malate dehydrogenase; Methyl-Seq, massive methylation sequencing; miRNA, micro RNA; MS, mass spectrometry; MTLE, mesial temporal lobe epilepsy; MTLE-HS, mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis; mTOR, mammalian target of rapamycin; NEFL, neurofilament light polypeptide; NGS, next generation sequencing; PCDH19, protocadherin 19; PK, pyruvate kinase; PNPO, pyridoxamine 5'-phosphate oxidase; PRDX2, peroxiredoxin-2; *Qdpr*, enzyme dihydropterina reductase quinoid; RNA-Seq, RNA-sequencing; RT-qPCR, quantitative real time PCR; *Rtel*, regulator of telomere elongation; SBL, in situ sequencing by ligation; SC, superior colliculus; scRNA, seq: single-cell RNA sequencing; SE, status epilepticus; seqFISH, sequential fluorescence in situ hybridization; SINEs, short interspersed nuclear elements; SLC25A22, solute carrier family 25, member 22; *Slc6a1*, solute carrier family 6, member 1; smFISH, single-molecule RNA fluorescence in situ hybridization; *Stat3*, signal transducer and activator of transcription 3; STXBP1, syntaxin-binding protein 1; *Timp-1*, tissue inhibitor of metalloproteinases 1; TIVA, the transcriptome in vivo analysis; TLE, temporal lobe epilepsy; TOF, time-of-flight; WAG/Rij, Wistar Albino Glaxo from Rijswijk; WAR, Wistar Audiogenic Rat; WES, whole exome sequencing; WGS, whole genome sequencing.

* Corresponding author at: Institute for Neuroscience of Castilla y León (INCyL), Laboratory 12, C/ Pintor Fernando Gallego 1., 37007, Salamanca, Spain.

E-mail address: lopezde@usal.es (D.E. López).

1. Introduction

Currently, epilepsy affects around 50 million people in the world [1], and its heterogeneous etiology includes structural alterations due to traumatic brain injury [2], genetic disorders [3], or idiopathic epilepsy with no certain cause [4]. Epileptogenesis is a dynamic and gradual process that involves changes in the brain after a precipitating injury or insult that results in the development of spontaneous recurrent seizure activity or epilepsy [5]. The complexity of this neurological disorder requires models for exploring different aspects of epilepsy [6]. Among the most used and well-characterized *in vivo* genetic models of epilepsy are those genetically predisposed animal species, in which seizures occur in response to high intensity acoustic stimulation, the so-called genetic audiogenic seizure models [7,8]. Genetic and protein alterations have been described as possible contributors to the development of epilepsy phenotypes in the audiogenic seizure models [9–11]. Thus, studies focused on molecular disruptions of the epileptogenic nucleus are of utmost interest, as they provide insights into the mechanisms involved in seizure susceptibility and regulation of neuronal excitability. Challenging these key assumptions may lead to discovery of molecular biomarkers, which can be used for the epilepsy diagnosis and prognosis as well as for assessing the efficacy of new antiepileptic treatments. In the present paper, we reviewed the molecular techniques used for the understanding of seizure susceptibility in genetic models of epilepsy, particularly in genetically epilepsy-prone rodents. We also compared the results obtained from the main models of epilepsy and showed some of our own findings to highlight the strengths and weaknesses of different molecular approaches.

2. DNA studies

The need to identify a large set of genes involved in complex human diseases has led to an increased use of molecular techniques in biomedical research and clinical practice. The discovery of genes associated with epilepsy, excluding those involved in metabolic disorders and intellectual disability that may present high prevalence of epilepsy, has exponentially increased from 30 to 90 genes in the last decade [12]. However, most pathologic genetic variants were identified in monogenic epilepsy and represent a small subset of all epilepsy types [13]. All of these achievements have been possible because of the development and cost reduction of next generation sequencing (NGS)-based panel tests that allowed the advent of multigene panels, exome, and genome-scale sequencing. Additionally, neurophysiological and molecular studies of mutations underlying seizure susceptibility might also contribute to the successful development of new therapeutic targets and antiepileptic drugs. A large percentage of the mutations identified in epilepsy involves altered genes that encode calcium, potassium, sodium, and chloride ion channels, making up a family of channelopathies [14], neurotransmitter receptors (e.g., γ -aminobutyric acid (GABA) receptors) [15], several structural proteins [16,17], mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway genes, modulation of synaptic vesicle docking and release (e.g., syntaxin-binding protein 1 [STXB1]) [18], cell signaling (e.g., cyclin-dependent kinase like 5 [CDKL5]) [19], cell-cell adhesion (e.g., protocadherin 19 [PCDH19]) [20], transcription (e.g., the aristaless-related homeobox gene (ARX)) [21], DNA repair the bifunctional polynucleotide phosphatase/kinase gene (PNKP) [22], mitochondrial glutamate symporter (e.g., solute carrier family 25, member 22 [SLC25A22]) [23], and enzymes involved in metabolic pathways (e.g., pyridoxamine 5'-phosphate oxidase [PNPO]) [24].

Despite these significant advances, much less is known about the altered genes in animal models of epilepsy, with the exception of those related to monogenic epilepsies. Animal models of epilepsy arose from artificial selection of seizure-susceptible strains over many generations that resulted in high predisposition to epilepsy, as is the case of audiogenic epilepsy models. Examples of rodent audiogenic seizure models are the Genetic Absence Epilepsy Rat from Strasbourg (GAERS; [25]),

the Wistar Albino Glaxo from Rijswijk (WAG/Rij; [26]), the Wistar Audiogenic Rat (WAR; [27]), and the genetic audiogenic seizure hamster from Salamanca (GASH/Sal; [7]). Activation of auditory pathways are required for the onset and progression of seizures in all audiogenic seizure models, and many studies pointed out the inferior colliculus (IC), a critical integration center in the auditory midbrain pathway, as the epileptogenic nucleus [6]. However, the genetic alterations underlying epileptogenesis in the IC are not fully known. With the increase in availability of genome-editing techniques that assess the relationship between mutation genotype and phenotype, nonrodent species like the zebrafish are also used to optimize and expedite genetic testing as well as development of antiepileptic drugs [28].

The multiple molecular approaches and the many options for linkage of different analysis may detect a number of mutations and DNA modifications involved in epilepsy. Fig. 1 depicts the analytic tools used in genome-wide studies of epilepsy as well as a brief description of their corresponding outcomes, showing possible genetic alterations. It should be noted that no single genetic testing has all the requisite capacity to contend with the complexities of all genetic mechanisms, and in some cases, the genetic variants identified through the variety of approaches are not fully understood [29].

2.1. Comparative genomic hybridization (CGH)

The comparative genomic hybridization (CGH) and, lately, arrays of CGH (aCGH) are the simplest approaches to study DNA variations, particularly if used species with known genome such as rat and mouse. The aCGH method allows reliable detection of DNA sites in multiple genome loci by comparing the relative amounts of DNA from two genomes, the control and the sample to be tested. Both samples are labeled with different fluorochromes that bind with DNA fragments of known sequences or “probes”, fixed to a slide or glass holder (Fig. 1A). The color of the fluorescence at each point of the aCGH informs about the relative amount of each DNA and allows inferring the presence of gains or losses in specific regions of the genome [30]. The aCGH method is used to evaluate targeted regions throughout the chromosomes for copy number variations (CNVs). There are commercial rodent microarrays that contain 720,000 probes/oligonucleotides of 50–75 mer (average size) and an average distance of 3537 pb. Those with less than 10 consecutive oligonucleotides are considered as an aberration. In the GASH/Sal model, we used commercial arrays of mice and found genomic alterations at the level of 17qE5. The gain and loss detected in this chromosome region could be indicative of CNVs, involving the neurexin I gene; however, no association with epilepsy was found (unpublished data). Mullen et al. [31] demonstrated that CNVs are overrepresented in patients with genetic generalized epilepsy, pointing out CNVs as an important risk factor. Taking into account the large pattern of genetic and phenotypic heterogeneity in epileptic syndromes, the applicability of CGH microarrays to evaluate the CNVs becomes controversial [32,33]. Olson et al. [34] suggested assessing CNVs through conventional chromosomal microarray to shed light upon the idiopathic epilepsy, but the greatest impediment for CNVs detection might be the limit size of 10 kb. In this regard, more recent studies argue in favor of using other techniques such as the whole exome sequencing (WES, see below) that is able to identify small CNVs less than 10 kb in size [35].

2.2. Whole genome sequencing (WGS)

The feasibility of implementing gene sequencing methods has made tremendous contributions to science advancement in general, and especially in epilepsy research. Although sequencing technologies, some years ago, were relatively expensive and time consuming, nowadays, a rapid development is taking place. Thus, novel sequencing platforms and supporting technologies involved in processes such as *targeting* and data analysis have emerged and are used routinely to reduce costs and determine the complete genome sequences of different species.

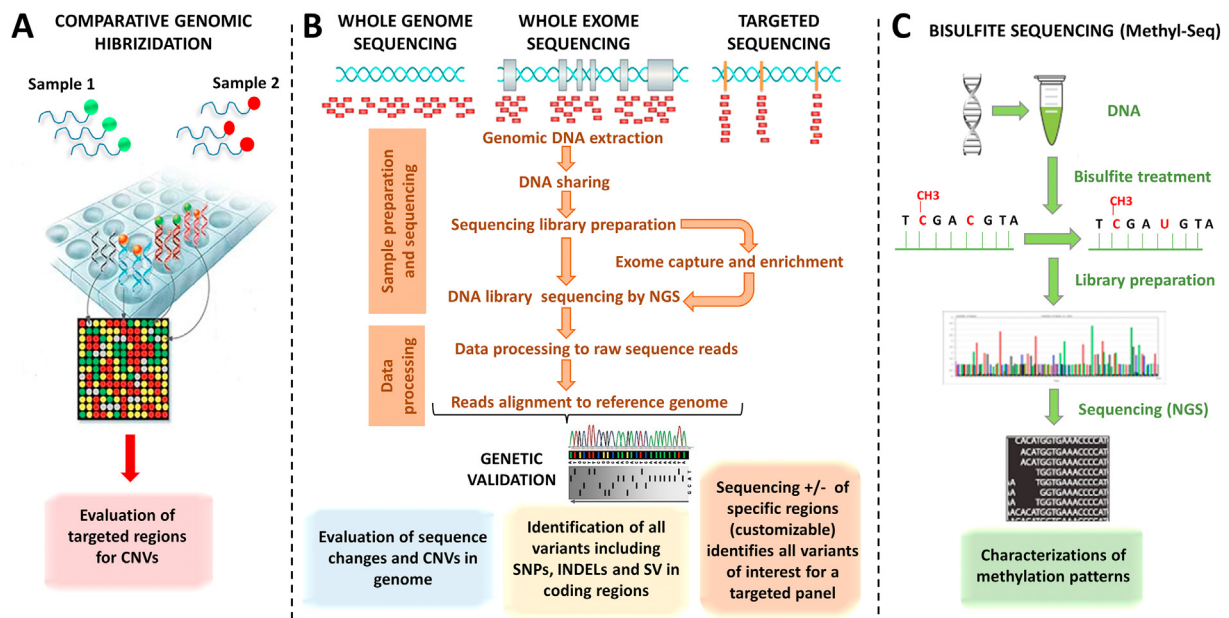


Fig. 1. Overview of techniques used for determining DNA alterations. A. Diagram of the microarray-based comparative genomic hybridization processes. Samples are labeled with fluorescent dyes and applied to the microarray. Complementary nucleotide sequences are bound to the microarray wells and the microarray scanner measures the fluorescent signals to generate plots. B. Workflow of genome, exome, or panel gene sequencing. The genomic DNA is cut into short fragments to generate of DNA library by PCR. Using NGS, the library is sequenced, and the corresponding data are analyzed through bioinformatics analysis. Finally, SANGER sequencing is necessary to confirm the mutations. C. Workflow of histone modifications analysis by Methyl-Seq. Genomic DNA is bisulfite-treated and nonmethylated cytosine residues are converted to uracils, then library is performed and sequenced in NGS platform, and are further analyzed using bioinformatics tools.

When whole genome sequencing (WGS) is applied to animal models of epilepsy, the identification of gene variants associated with epilepsy is possible by comparing differences between the WGS on the wild type and the epileptic strain (Fig. 1B).

As an example, the complete genome sequence of the GAERS was performed bringing promising results [36]. The GAERS model shows a genetic generalized epilepsy that is analogue to the human absence epilepsy as verified by electroencephalic, pharmacological, and behavioral results, and like the human condition, this model appears to have a complex genetic architecture. The GAERS genome study identified 1.12 million single nucleotide variants, 296.5 K short insertion-deletions, and 354 putative copy number variants that result in complete or partial loss/duplication of 41 genes. Among the variants with high quality criteria, 25 variants gain a stop codon, 56 have putative essential splice sites, and 56 were predicted to result in a frameshift mutation. The information obtained from the GAERS genome study was too extensive and varied that the analysis is still in progress, and it is difficult to make a correlation with genetic modifications responsible for seizure susceptibility [36]. The WGS approach can also be applied to identify susceptible genes in human, which may allow high rates of molecular diagnosis in patients with epilepsy and increase the identification of epilepsy genes [37,38].

2.3. Whole exome sequencing (WES)

The WES, a genomic technique for sequencing the entire protein-coding region of genes in a genome, may be an excellent option when other methods fail (Fig. 1B). Allen et al. [39] used WES to investigate mutations in epileptic encephalopathies and found 329 de novo mutations; some of them have a clear statistical evidence of association with epileptic encephalopathy, such as *GABRB3* (that encodes the subunits beta 3 of the GABA type A receptors) and *ALG13* (that encodes the ALG13 UDP-N-Acetylglucosaminyltransferase Subunit).

The WES, despite its high potential, is not commonly used in experimental models of epilepsy. However, it was seemingly a good choice in the first genetic studies of the GASH/Sal model, as the genome used as a reference was incomplete. Once the DNA is isolated and fragmented, it

is necessary to create a genomic library. To do this, the oligonucleotides are amplified via polymerase chain reaction (PCR), then transcribed *in vitro* in the presence of biotinylated uridine triphosphate (UTP) to generate single-stranded RNA “bait.” Genomic DNA is sheared, ligated to Illumina sequencing adapters, and selected for lengths between 200 and 350 bp. A quality control of the sequences is carried out with the FASTQC program [40], assembling those that pass the checking with the SPAdes program [41]. As a result, the genome can be compared with the sequences of the reference genome, identifying point mutations, structural variations, and genomic reorganizations by using the GATK, the Lumpy, and the MAUVE software, respectively [42–44]. After a bioinformatics analysis, the variants with higher or lower impact can be obtained [45]. Although the WES data analysis is a difficult task, variant catalogs such as ClinVar [132] and Human Gene Mutation Database (HGMD) [133] are suitable for guiding variant classifications among known disease genes, which facilitate the interpretation of a novel missense variant. Despite this, the final variant interpretation can be a highly subjective process, contributing to the variability reported in variant classification. For this reason, the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) has drastically reduced variability in the classifications by systematizing the variant interpretation process.

The WES has also some limitations, for example, it is not able to detect alterations in noncoding regions or methylation abnormalities, and hence, the use of other techniques is required [46,47].

Several studies performed different techniques in a complementary way to identify deleterious genetic variants in epilepsy and to detect the responsible genes for a given type of epilepsy. For example, a combination of aCGH, targeted sequencing, and WES successfully allowed the identification of de novo mutations that affected the maturation and development of neural networks [48].

The WES results must be validated, ensuring that the mutations are found in all tested animals. To do so, primers near the mutated regions are designed to subsequently amplify those regions and perform the SANGER sequencing (Fig. 1C).

The large number of gene variants detected in the GASH/Sal using WES analysis allowed us to identify high impact mutations in genes

that might be related to epilepsy (unpublished data). A first step to reduce such a big number of gene variants is to filter out based on the mutation characteristics. Once the variants of interest have been identified, the next step will be to assess the implication of each gene variant in the seizure susceptibility.

2.4. DNA modifications

The study of DNA modifications includes DNA methylation, specific chromatin changes such as histone modifications, and noncoding RNAs among other components that are tightly interconnected. All these DNA modifications form integral part of the epigenetic machinery that regulates the gene expression [49,50]. Alterations in DNA methylation of specific genomic regions may contribute to the development of complex disorders (e.g., Prader–Willi and Angelman syndromes), as they could prompt cells to gain or loss biological functions of genes typically expressed only from the maternal or the paternal copy [51,52].

Recent studies show that epilepsy and epileptogenesis are associated with changes in each of the factors that affect the epigenome [134]. Aberrant DNA methylation signatures link general pathomechanisms of epileptogenesis and epilepsy to epileptic brain tissue in experimental animal models and humans. The repressive capacity of cytosine DNA methylation is mediated by recruitment of silencing complexes, in which methyl–CpG binding domain proteins aid in the mediation of gene silencing. There are standard procedures used to study those modifications and patterns of methylations based on the bisulfite conversion of genomic DNA, methylation-sensitive restriction enzyme digestions, and the immunoprecipitation of methylated DNA using methyl CpG-specific antibodies [53]. The procedure consists of fragmenting the genomic DNA, enrichment of methylated DNA (using commercial methylated DNA-binding enrichment kit), preparation of the MethylC-sequencing library in NGS platforms (e.g., Illumina, SOLiD, or Ion Torrent), and finally, assessment using bioinformatics data analysis (Fig. 1C). These methods have been carried out in rodent models of epilepsy, suggesting that altered DNA methylation patterns contribute to pathological mechanisms that induce genetic deregulation in epilepsy syndromes. In chronic epileptic rats, Kobow et al. [50] reported an increase in DNA methylation, mainly confined to gene bodies. These altered methylation patterns were inversely correlated with the gene expression, so that an increase in gene body methylation was associated with gene silencing and, conversely, a decrease in methylation was associated with increased gene expression. The calcium/calmodulin-dependent protein kinase 2 (*Camk2*) gene that encodes a calcium-dependent protein kinase was found hypermethylated and downregulated, which may be linked to aberrant neuronal activity and seizure. Moreover, interleukin 10 receptor subunit beta (*Il10rb*) gene that encodes an interleukin receptor protein was found hypermethylated and upregulated, which could be a compensatory mechanism to limit brain damage following recurrent seizures. Administration of ketogenic diets to epileptic rats was found to have anticonvulsant activity, ameliorating DNA methylation changes [50]. Consistently, similar studies also revealed increased methylation in gene bodies and hypomethylation at nongenic regions, supporting the idea that altered DNA methylation is a general pathomechanism associated with epileptogenesis and epilepsy in these models [49,54]. Further, *in vitro* experiments correlated posttranscriptional modifications of histones (H3/H4 acetylation and H3 phosphorylation) with downregulation in the expression of two potential epilepsy-associated genes, the excitatory glutamate receptor genes glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2 (*Gria2*) and glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2A (*Grin2a*) [55]. Also, increases in histone H4 acetylation and in phosphorylation of histone H3 have been reported in animal models of epilepsy [56–58]. Based on these results, several studies have been developed histone deacetylase (HDAC) inhibitors as a possible therapy in epilepsy, since HDAC inhibition has a neuroprotective effect [57], but without a principal anticonvulsant action [59,60].

3. Gene expression studies

The fact that RNA-based approaches provide answers that cannot be revealed by conventional DNA-sequencing approaches have contributed to resolve great conundrums in epilepsy research.

3.1. Microarrays

The development of global gene expression profiling platforms has revolutionized research in molecular biology, allowing identification, cataloging, and measuring of vast amounts of information at a single time. The corresponding genomic changes are consistent, and hence, these techniques give us a broader perspective for understanding the disease process. The late 1990s heralded the development of several important technological advances in molecular biology, specifically the DNA microarrays that were used for comparing global gene expression in experiments at different conditions. This has led to flourish a relatively new field of comparative genomics [61]. DNA microarrays generate large libraries of mRNA sequences, enabling researchers to compile differential gene expression lists in disease states by statistical comparison of transcript frequencies between two or more conditions (Fig. 2A). It allows simultaneous monitoring of thousands of genes, thus providing a functional aspect to sequence information in a given sample. There are several types of microarray technologies currently in use, and among them, the oligonucleotide microarray technology is the most widely used for high-throughput quantitative studies of RNA expression [62]. As shown in Fig. 2A, RNA extracted from the material of interest is reverse transcribed to complementary DNA (cDNA) and then incubated with a mixture of fluorescent markers on a microarray chip that contains a predetermined set of genes. Quantification is then performed by computerized measurements of fluorescent intensities. Known limitations of microarray technology are the large amounts of material at the initial stage and the unfeasibility to identify novel genes, as it relies on prior knowledge of the targeted genes. These have largely been addressed with a two-stage hybridization process or global RNA amplification prior to running the array experiment [61,65]. The molecular mechanisms underlying epileptogenesis are thought to be associated with altered expression of gene groups [66], and the microarray has been the preferred platform for their gene expression analysis [61,67]. In the last 20 years, there have been published more than 40 large-scale gene expression studies on epileptic tissue obtained from resection of the epileptogenic zone [11,61,66–79]. Furthermore, mainly in the last decade, some works aimed to study the potential genes or pathways associated with epilepsy based on micro RNA (miRNA) expression profiles [80–84]. Numerous attempts have been made to employ transcriptional expression profiles in animal models, as well as in patients with temporal lobe epilepsy (TLE). Despite this, there is no consensus regarding common transcriptional drivers of epileptogenesis [66]. Variability among animal species, epilepsy models, different sample size, tissue sampling time-points, array platforms, and normalization algorithms, have resulted in only a few genes demonstrating a consistent expression change [66,68,70]. Thus, many studies reported the same differentially expressed genes related to epilepsy, such as tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (*Timp-1*), signal transducer and activator of transcription 3 (*Stat3*), complement C1q chain (*C1q*), solute carrier family 6, member 1 (*Slc6a1*), and *Pcdh19* [70]. All these genes share the common characteristic of belonging to different pathways, some of which are related to epileptogenesis, such as the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway, the Janus kinases/signal transducer and activator of transcription proteins (JAK/STAT)09 pathway, p53 signaling pathway, and the extracellular matrix (ECM)/integrin signaling [70]. Interestingly, genes like *MAPK*, *HIF*, and *JAK/STAT* are potentially associated and upregulated under a common hypoxic condition in a HIF-dependent manner [85].

By using microarrays, our research group analyzed changes in gene expression of the IC in two audiogenic seizure strains, the WAR and

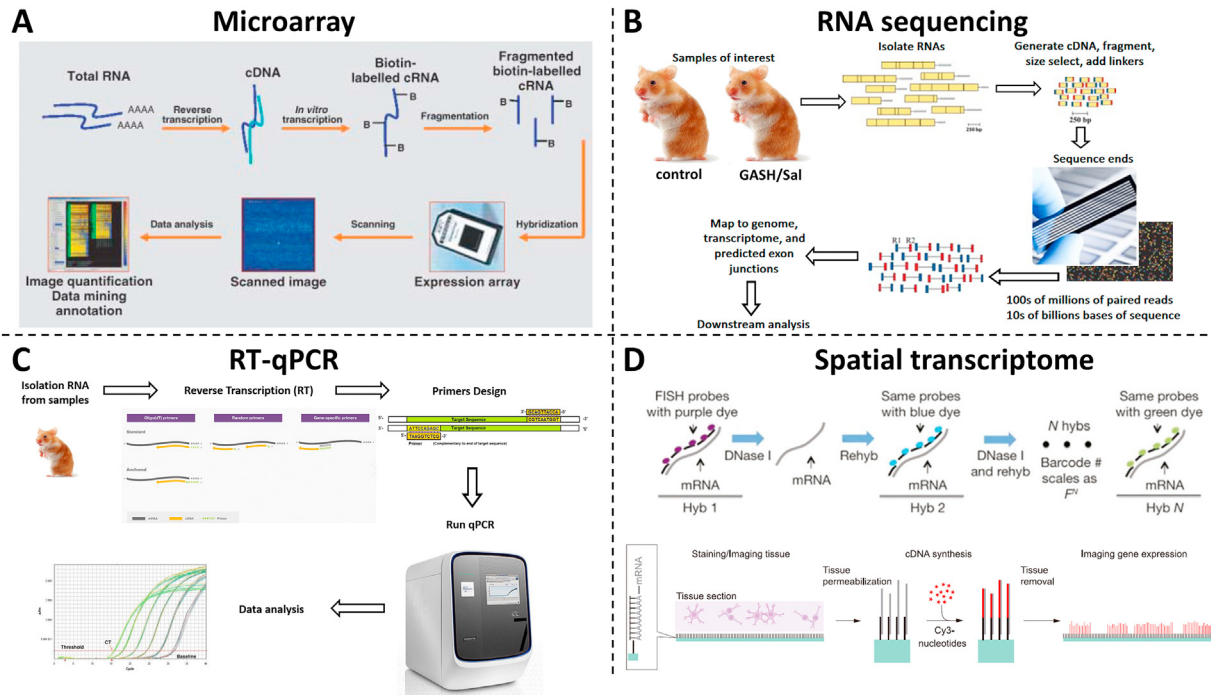


Fig. 2. General workflows for differential gene expression analysis using different techniques. Schemes show the standard workflow of microarray (A) (reproduced with permission from [62]), RNA sequencing (B), RT-qPCR (C), and spatial transcriptome studies (D) [smFISH (reproduced with permission from [63]) scRNA-Seq (reproduced with permission from [64])].

the GASH/Sal models, and compared with age-matched controls under the same stimulation conditions. The microarray results showed that the genomic profile of the WAR animals exhibited significant upregulation of 38 genes and downregulation of 47 genes when compared with Wistar rats. Comparison of gene expression profiles between stimulated control and GASH/Sal hamsters revealed the upregulation of 10 genes and the downregulation of 5 genes. Finally, the comparison of the gene expression profiles between the two audiogenic seizure models showed only one common gene, the zinc finger immediate-early growth response gene early growth response protein 3 (*Egr3*), which was upregulated in both cases. We hypothesized that their overexpression in both models might contribute to neuronal viability and development of lymphoma in response to stress associated with audiogenic seizures [11].

Microarray studies have also been shown to demonstrate significant variations even under the same experimental conditions. As mentioned below, the validation of global expression profiling results by independent methods such as quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR), Northern/Western blotting, and immunodetection is essential [61]. On the other hand, microarray technology has certain limitations such as the low sensitivity and high false-positive rates [86]. One way of overcoming these drawbacks is to use meta-analysis methods that integrate the results of separate microarray studies and increase both the sensitivity and the reliability of measurements of gene expression changes [75,86].

3.2. RNA-Seq

The first decade of this millennium witnessed the advent of massive parallel sequencing, also known as deep sequencing or NGS. Thus, RNA-sequencing (RNA-Seq) is now the method of choice to study gene expression and identify novel RNA species. RNA-sequencing has several advantages over microarrays. First, sequencing technology is much more sensitive and quantitative than arrays. Second, RNA-Seq provides a larger dynamic range for detection of transcripts (>9000-folds) compared with standard arrays. Third, sequence data are more specific and have less background. Furthermore, sequencing experiments do

not depend on the limited probes present on tiled microarrays and can, therefore, be used to challenge any location in the genome, including unannotated genes. Finally, sequencing is not limited by array hybridization chemistry, such as melting temperature, cross-hybridization, and secondary structure concerns. In conclusion, RNA-Seq directly reveals sequence identity that is crucial for analysis of unknown genes, novel transcript isoforms, and genetic variations [87,88].

Most RNA-Seq experiments are carried out on instruments that sequence DNA molecules due to the technical maturity of commercial instruments designed for DNA-based sequencing. Therefore, as shown in Fig. 2B, cDNA library preparation from RNA is a required step for RNA-Seq. Each cDNA in an RNA library is composed of a cDNA insert of certain size (previously RNA or cDNA fragmentation), and flanked by adapter sequences, as required for amplification and sequencing on a specific platform. The cDNA library preparation method varies depending on the RNA species under investigation, which can differ in size, sequence, structural features, and abundance. Moreover, because of the detection limit of most sequencers, several cDNA libraries need to be amplified by PCR before sequencing, and to correct for PCR amplification bias, using methods that eliminate PCR duplicates from sequencing results [88]. After, directly cDNA libraries, or subsequent PCR products, are sequenced using NGS, producing millions of short sequence reads, typically 30 to 500 bp in length, depending on the DNA-sequencing technology used. Finally, the reads obtained after sequencing are either aligned to a reference genome or transcriptome, or assembled de novo without genomic sequence guidance, to create a genome-scale transcription map that provides both transcriptional structure and expression level for each gene. Thus, the number of reads mapped within a gene or an exon can then be used as a measure of its abundance in the analyzed sample [87].

Increasingly available data in RNA-Seq databases will help the neuroscience community to make new discoveries at unprecedented speed and depth. However, many challenges still remain. For example, most of the read counts are produced by very highly expressed genes. Many genes of interest with low expression levels may have gone undetected because of very low read counts. These low read counts can also be quite variable, which can cause biases in differential expression analyses [87]. Up to now,

RNA-Seq had been employed at least in 10 reports to profile the entire transcriptome across multiple phases of epileptogenesis in different animal models of epilepsy, as well as changes in transcription at the chronic phase in humans [10,11,82,89–95].

Thus, the transcriptional profile of the corpus quadrigeminum, comprised the inferior and superior colliculi, in WAR animals was recently described [10]. Transcriptomic analysis of WAR (versus Wistar rats) after acoustic stimulation allowed us to identify a set of 62 and 16 differentially regulated genes using two types of statistical packages (EdgeR and DESeq), such as a gene that encodes the coenzyme acyl-CoA synthetase (*Acs3*), G-protein coupled receptor 126 (*Gpr126*, encodes a receptor that could be associated with alterations in the acquisition or the processing of acoustic information), regulator of telomere elongation (*Rtel*, encodes a helicase that acts in the protection, stability, and elongation of telomeres), and enzyme dihydropterina reductase quinoid (*Qdpr*, encodes the enzyme dihydropterina reductase quinoid that is responsible for recycling of BH₄, a molecule that acts as enzyme cofactor and is involved in the synthesis of serotonin, dopamine, and nitric oxide). Gene Ontology (GO) enrichment analysis showed that “catalytic activity” and “metabolic processes” categories were among the most represented functional categories of the genes differentially regulated in WAR, suggesting that the model presents metabolic alterations [10].

On the other hand, our research group analyzed also the transcriptome of IC of the GASH/Sal model in comparison with their control under the same stimulation conditions. We previously used the mouse probes for the microarray analyses of gene expression (GeneChip® Mouse Gene ST Array) in hamsters as the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) probes were not available at that time. To confirm these results, we employed Chinese hamster probes (*Cricetulus griseus*) via transcriptomic analysis, comparing the stimulated controls with the stimulated GASH/Sal. Upon using these probes, the number of differentially expressed genes between GASH/Sal and control animals was increased [11].

In other study, Dixit et al. [91] performed transcriptome analysis of hippocampal tissues resected from patients with mesial TLE with hippocampal sclerosis (MTLE-HS), using the RNA-seq approach. Differential gene expression analysis revealed 56 significantly regulated genes in MTLE (vs. controls without epilepsy) and their possible association with epileptogenesis and/or pharmacoresistance in MTLE-HS. Gene cluster analysis identified three important hubs of genes mostly linked to the following: 1) neuroinflammation and innate immunity; 2) synaptic transmission (as a gene encodes kinesin heavy chain isoform 5A [*KIF5A*], involved in GABA(A)R trafficking, and whose deletion causes epilepsy); and 3) neuronal network modulation (as a gene encodes fibronectin [*FN1*] and proposed cerebrospinal fluid [CSF]-serum biomarker for epilepsy), which are supportive of intrinsic severity hypothesis of pharmacoresistance [91]. Furthermore, by using this same technique, a previous study reported that the status epilepticus (SE) induced changes in the hippocampal RNA expression in an animal model of pilocarpine-evoked SE [93]. These authors performed whole transcriptome profiling to identify differentially expressed mRNAs at 12 h, 10 days, and 6 weeks after evoking experimental SE, which correspond with the distinct phases of the epileptogenic process (acute, seizure silent, and spontaneous-seizure phases).

Recently, Jehi et al. [96] also proposed that the maturation of a new epileptic focus may explain late seizure recurrences. Using RNA-seq, they identify 29 differentially expressed genes between late-recurrence and seizure-free patient samples, concluding that late recurrences after epilepsy surgery may be influenced partly by differences in gene expression in neuroinflammatory and brain healing/remodeling pathways [96].

Finally, it is noteworthy to highlight the fact that transcriptome analysis can also be performed at the level of single cells. Unlike classical methods, which consider mixtures of heterogeneous cell populations, single-cell RNA sequencing (scRNA-Seq) provides a much more detailed view of transcription dynamics [135]. For example, the analysis of transcriptomes from single cells has revealed the substantial transcriptional heterogeneity among seemingly identical cells [97]. Recently,

Skene and Grant [98] applied the expression-weighted cell-type enrichment (EWCE), a method that uses single cell transcriptomes to generate the probability distribution associated with a gene list that has an average level of expression within a cell type. Also, these authors applied EWCE to human genetic data from cases of epilepsy among other neurologic pathologies [98]. By last, as mentioned below, a study describes a method called fluorescent in situ RNA sequencing (FISSEQ), which enables not only the study of the transcriptomes of single cells but also the determination of the precise location of each transcript within the cell [99].

3.3. RT-qPCR

After data mining obtained by microarrays and RNA-Seq, the results need to be validated with highly reliable biotechniques that allow precise quantitation of transcriptional abundance of the identified genes.

The RT-qPCR technology is central to biomarker validation where potential markers need to be measured with greater accuracy and precision in larger sample sets. RT-qPCR represents the method of choice for analyzing gene expression of a moderate number of genes in anywhere from a small number to thousands of samples [100–102]. Quantitative real time PCR allows quantification of PCR products in “real time” during each PCR cycle, yielding a quantitative measurement of PCR products accumulated during the course of the reaction. Real-time reactions are carried out in a thermocycler that permits measurement of a fluorescent detector molecule, which decreases postprocessing steps and minimizes experimental error (Fig. 2C). Quantitative real time PCR is most commonly achieved through the use of fluorescence-based technologies such as probe sequences that fluoresce upon hydrolysis (TaqMan) or hybridization (LightCycler), fluorescent hairpins, or intercalating dyes (SYBR Green) [103]. The majority of analyses of RT-qPCR data use relative quantitation that is easier to measure and are of primary interest to researchers examining disease states as epilepsy. In epilepsy research, the most common method is the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method that relies on two assumptions [104]. The first is that the reaction is occurring with 100% efficiency; in other words, with each cycle of PCR, the amount of product doubles. The second is that there is a gene (or genes) that is expressed at a constant level between the samples. This endogenous, housekeeping, or reference gene will be used to correct for any difference in sample loading [103]. Housekeeping genes such as β -actin, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, cyclophilin, or tubulin are commonly used since they are ubiquitously expressed in cells and tissues. In a model of TLE, Crans et al. [105] have recently validated two rodent-specific short interspersed nuclear elements (SINES) as reference genes, comparing these with other nine genes and using three types of algorithms: geNorm, NormFinder, and rank aggregation. Our research group, as mentioned above, investigated the comparison of the gene expression profiles between two audiogenic seizure models using the microarray data, showing upregulation of *Egr3* in WAR and GASH/Sal animals [11]. By using RT-qPCR studies, we confirmed the differential expression of the *Egr3* as well as in the two other early growth response proteins 1 and 2 (*Egr1* and *Egr2*), which were also upregulated in both models. Differences between microarray and RT-qPCR data might occur for the following reasons: 1) the use of different probes in the microarray and RT-qPCR experiments, which may lead to capture differential expression in splice variants; 2) differences in the methods used for the normalization of expression data; and 3) possible false positive outcomes of expression changes. In addition, lower correlations between RT-qPCR and microarray results were consistently reported for genes exhibiting small degrees of changes [106].

3.4. Spatial transcriptome

The advance in sequencing technologies makes possible the study of the genomic and transcriptomic of single cells and tissues. The

complexity of multicellular organisms requires the design of high-throughput measurements that preserve spatial information about the tissue context or subcellular localization of the analyzed nucleic acids. Some applications of this approach are intended to measure gene expression and activity for thousands of genes in multiple regions of the brain [107–110].

The single-molecule RNA fluorescence in situ hybridization (smFISH) technique represents a powerful means of gauging individual RNA expression values from single-cell transcriptome-wide measurements. However, the number of transcripts that can be visualized simultaneously in the same sample is small (usually 1–3) because of the limited availability of fluorophores with nonoverlapping spectra, which prevents highly multiplex measurements. An improvement of this method is the so-called sequential fluorescence in situ hybridization (seqFISH), which implies increasing multiplexing by the use of spatial or sequential barcoding that is combined with super-resolution microscopy. Thus, each transcript is identified through multiple cycles of hybridization, imaging, and probe removal (Fig. 2D).

Other alternative method to visualize RNA molecules in situ is based on smFISH that uses padlock probes and rolling circle amplification as well as branched DNA probes [107,109,110]. This strategy combines smFISH and scRNA-Seq, allowing visualization and quantification of the transcription with spatial resolution in tissue sections [64].

Also, laser capture microdissection (LCM) is a powerful technology that enables the isolation of cells or small tissue regions from defined anatomical locations. Data sets derived from these samples correlate directly with the known original location, thus preserving spatial information. Nucleic acids can be extracted from LCM-captured cells and used in a variety of downstream applications, including gene expression microarrays and RNA-seq.

Other approach for spatially resolved transcriptomics based on RNA extraction from discrete tissue regions is the serial microtomy sequencing. In this method, RNA is extracted from single thin tissue cryosections and subjected to sequencing. To improve spatial resolution and quantification of this technique, a modified approach named RNA tomography sequencing method (Tomo-seq) has been developed [107,110].

The transcriptome in vivo analysis (TIVA) based on RNA extraction and sequencing of selected neurons within tissue slices allows characterization of gene expression profiles in accurate brain locations [107,110,111].

4. Proteomic

Proteomics refers to the large-scale analysis of proteins and deals with the study of protein compositions, including those derived from the posttranslational modifications, as well as protein interactions. The proteomic technologies also involve the identification and quantification of overall proteins, and hence, are well-suited for understanding the changes that occur in the epileptogenic tissue after seizures. One of the major applications of proteomics is to find useful markers for the diagnosis, treatment, and monitoring of various clinical entities. In this regard, a principal objective of the epilepsy biomarker discovery is to identify “hot lesions” in epileptogenic brain tissues that express a highly specific and sensitive biomarker signature [5]. For this reason, determining the proteomic profile differences in the epileptogenic nuclei of the audiogenic seizure models provides crucial information about the mechanisms involved in seizure susceptibility and regulation of neuronal excitability.

Unfortunately, the results from proteomics studies are very variable as they depend on the sample preparation method, the separation between nuclear and cytoplasmic components, the type of protein extraction, and the high biological variation between individuals. Finally, unlike the DNA stability, the proteome (and transcriptome) varies in space and time, thereby contributing to the great heterogeneity of results that can be found in the literature. The existing process templates for large-scale study of proteins are shown in Fig. 4.

4.1. Two-dimensional electrophoresis (2DE)

The two-dimensional electrophoresis (2DE) is the typical method to separate proteins in two dimensions according to their isoelectric point, molecular mass, and solubility, using a polyacrylamide gel. Then, the gel is stained using different dyes — such as Coomassie blue or silver nitrate. Another way is to use fluorescent reporters to identify the target samples as in the 2D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis (2D-DIGE) (Fig. 4A). This technique has the advantage to directly display the relative abundances and patterns of protein isoforms in the samples. In this case, protein spots are considered as differentially expressed with statistical significance when 1) they are present at least in 70% of the gel images, 2) a 1.5-fold change as a threshold average ratio, and 3) p-values lower than 0.05. For this analysis, different software programs are employed for image capturing (i.e., Ettan™ DIGE Imager, GE Healthcare), image analysis (i.e., DeCyder™ Differential Analysis Software, GE Healthcare), and image quantification and selection of quantitative changes [113].

In the samples separated by simple 2DE and DIGE, the protein spots of interest are manually excised from the stained gels, de-stained, and subsequently subjected to in-gel digestion with trypsin. After protein extraction, they are further analyzed with a mass spectrometer [high-performance liquid chromatography (HPLC)/mass spectrometry (MS)–MS or by matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometer for fluorescent samples] (see next section for more information). Different spectra are analyzed with specific software (i.e., FlexAnalysis 3.3.65, Bruker Daltonics), using different algorithms (i.e., MASCOT - Matrix Science, London, UK or X! Tandem <http://www.thegpm.org/tandem/>).

There are many databases that can be used to identify the protein sequences in molecular studies of rodent models of epilepsy. Among them, <http://kr.expasy.org> or database of SwissProt 2015_06, in which 1612 Rodentia sequences are available.

This technique has been used to analyze changes in brain tissue of the WAG/Rij model after induced seizure enhancement, showing 16 differentially expressed proteins in the frontoparietal cortex and 35 proteins in the thalamus [113]. Four of them were found in both brain areas and were related to metabolism [ATP synthase subunit d, mitochondrial protein (ATP5H) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)] and glial activation [glial fibrillary acidic protein (GFAP) and neurofilament light polypeptide (NEFL)], which are able to modulate voltage-gated calcium channels [114]. Consistently, 2DE performed in the epileptogenic nucleus of naïve GASH/Sal animals also showed alterations in proteins related to metabolism, with a significant decrease of ATP5H as well as increases in GAPDH and malate dehydrogenase (MDH1). In addition, 2D-DIGE analyses were carried out to compare the proteomic profile of baseline and postseizure states, showing nonsignificant differences in the epileptogenic nucleus of the GASH/Sal (unpublished data). The most striking differences were found between control and GASH/Sal at baseline conditions, showing an increment in the metabolism protein pyruvate kinase (PK) and ATP synthase beta subunit (ATP5F1B), along with an elevated concentration of peroxiredoxin-2 (PRDX2) in the IC. Additionally, the induction of epileptic seizures made the PRDX2 to switch from a 9.62-fold increase to a 4.05-fold decrease, which suggests an impairment of the antioxidant systems. These data are in agreement with other results in Lafora Disease mice models [115].

4.2. Mass spectrometry and MALDI-TOF

Mass spectrometry is an analytical technique that measures the mass-to-charge (m/z) ratio of ions. In this procedure, the samples are ionized into charged molecules and then subjected to an electric field in the mass analyzer, which determines the acceleration of the sample toward a detector, so that the ratio of their m/z can be measured. In the MALDI-TOF MS, the ion source is the matrix-assisted laser

desorption/ionization (MALDI), and the mass analyzer is time-of-flight (TOF) analyzer (Fig. 4B). It is the technique that must be used when the samples are attached to a fluorescent (i.e., DIGE). In proteomics, one of the most important and difficult step is the separation of complex

peptide or protein mixtures prior to their detection and data analysis. This step was done in the past using HPLC–MALDI-MS that performs offline peptide separation and spotting or fraction collection. The fact that this technique involves time-consuming manual inspection for

Table 1

Massive analysis in rodent genetic models of epilepsy shows dysregulated proteins and their corresponding functional pathway.

Reference	Model organism	Epilepsy subtype	Anatomical area of study	Proteins upregulated (symbol)	Proteins downregulated (symbol)	Classification/function
Penot et al. [136]	Kainate injection in hippocampus of mouse	MTLE	Hippocampus	IL-1beta; IL-1Ra; SOCS3; COX-2 cPLA(2) α		Cytokines, inflammatory processes apoptosis
Danis et al. [137]	Genetically modified rat GAERS	AbE	Cortex Thalamus Hippocampus	ATP5F1D; TMEM70 MBP; MIF MIF; HBB		Energy generation membrane conductance inflammatory processes Oxygen transport
Huang et al. [138]	SD rats injected intraperitoneally with lithium chloride and then pilocarpine twice	TLE	Hippocampus	HSP27 TRIP6; LIMK1; FBA, CK MBP	PPIase TUBB; ACTB; INA GADPH; SCOAL; ACO	Stress response Cytoskeleton Metabolism
Jiang et al. [139]	Phenytoin in electrical amygdala-kindled rats	RefE	Full brain	VDAC1 GADPH; TP11; ALDOA TUBB2 HSP-27 TUBA; EZR DPYSL2 DHPR UQCRRF51	SNX3 VDAC2 MT-ATP; GLUD1; MDH ABCB10; NDUFA10; HSP-70 ACO; ALDH; CFL1	Intracellular trafficking Membrane conductance Energy generation Mitochondrial transport Stress response metabolism cytoskeleton Stress response cytoskeleton Endocytosis production of neurotransmitters
Greene et al. [140]	Lithium pilocarpine-induced rat	CStE	Hippocampus			
Junker et al. [141]	Kindled rats	RefE	Hippocampus			Mitochondrial respiratory chain
Walker et al. [142]	Rats, electrically-induced status epilepticus	StE	Parahippocampal cortex Hippocampus	HSP90B1 HSPA1A IL1rap11; ITGB2;RPS27A HMGB1; HSP90B1; HSPA1A; TMED7; TOLLIP	DNM3;IL1RAP TOLLIP; USP7	Immune and inflammatory responses
Bitsika et al. [143]	KA-MTLE mouse model	MTLE	Hippocampus	TRF; GFAP; VIM; CLU; DHRS1; FLNA; HEXB; FLNA; APOD; TGM1; CAPG; CTSZ	MAP2; CTTN; PPP1R9B; MAP1A; AAK1; BAIAP2; RPH3A; SLC6A1	Cytoskeletal proteins neuronal responses Microglia/Astrocyte Activation Inflammatory Response
Györfly et al., [113]	WAG/Rij rats	AbE	Frontoparietal cortex Thalamus	GFAP;GAPDH PSME1; UQCRC1 HNRNPA2B1 GFAP; CAPG INA; DPYSL2 MYL1; TUBB PRDX6;ENO1 MDH1; SEPT3 ATP6V1E1 PARK7; APOE	ATP5H; NEFL LMN; SUCLA2; GUK1 GFAP; ACTA2 MYH1; NEFL ATP5H; GAPDH LMN; TIP1 MDH1;HNRNPH2 ATP6V1E1	Cytoskeletal proteins Motor proteins Chaperone/oxidative stress metabolism ATP synthesis/respiratory chain signal transduction transcription/translation synaptic transmission Cytoskeletal proteins
Liu et al. [144]	Pilocarpine rat model	TLE	Hippocampus	NEFM; NRP2; HSP90AA1; DDT HSPA1A; ANXA6; VDAC2 SEMA6B; PKM TUBA1B; SYN2 HOMER2; INA ATP5F1B; SPTA1; NRGN MSI1; COX6B1	ACTA1; TUBB2B; ACTB; ENOSF1; PDHA1; ENO1; ALDOA; PRPS1; HSPD1; SNAP25; STMN1; ARHGDI A; UBE2E2; HBA1/2 AK1; TAGLN3; NADPH; GSTM1; HBB	Metabolism Stress response energy metabolism
Li et al. [145]	Pilocarpine mouse model	TLE	Dentate gyrus	PFN1; UCHL1 ARHGDI A; CA2 PPID; CRYAB SNCB; PRDX6 ENO2; LAMP2 VIM; CTSD HSPB1	ACTB; LDHB PDXP; CRYM HNRNPDL; APOA1 GRHPR	Cytoskeletal proteins Metabolism Stress response Apoptosis synaptic transmission
Wu et al. [146]	Lithium pilocarpine-induced rat treated	MTLE	Hippocampus	ACBP; CAH2 CAH5A; CH10 COF1; CX6B1 FBP7; GADPH GFAP; GLOD4 HBA; KAD1; KCRB NRGN; PDIA3; PPIA; PRDX1; TTR; UB2V2		Cytoskeletal proteins synaptic function energy metabolism mitochondrial function molecular chaperones signal regulation

subsequent MS analysis resulted in very low separation efficiencies [116]. Currently, there are multiple automated liquid chromatography (LC)/MS platforms that allow the separation of proteins and MS analysis automatically [117]. The automation of procedure has yielded the separation of thousands of proteins in each sample and has become the regular method of choice when it is desired to produce a high-level proteomic profile in the sample. The main limitation of the LC/MS is the fractionation of the sample prior to the MS analysis, which makes that the large amount of proteins produced by the LC separation can quickly saturate the capacity of the spectrometer detector.

4.3. Massive analysis

Another approach, especially useful for the analysis of complex protein mixtures, is to carry out a global analysis, the so-called Shotgun proteomics. This technique refers to the use of bottom-up proteomics techniques in identifying proteins in complex mixtures by using a combination of LC/MS. The most common method of shotgun proteomics starts with the digestion of proteins in the mixture and subsequently the separation of the resulting peptides by LC. Tandem MS is then used to identify the peptides (tandem MS or MS–MS) (Fig. 4C). This sequential MS provides detailed information on the sequence of the peptide, which is compiled, constituting the primary technique for the genesis of the “peptide trace”. Using this technique, several authors describe a list of proteins related to changes in the brain of different epilepsy models (Table 1).

In the GASH/Sal model, some dysregulated proteins are still unknown, 5.63% are upregulated and 22.22% are downregulated. In general, there is a great variability of proteins that could be classified in different functional categories (Fig. 3) according to the PHANTHER method [118].

4.4. Isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ)

Mass spectrometry analysis can also be used directly to quantitatively explore the proteome, applying isobaric tags for a relative and absolute quantification (iTRAQ)-based proteomics approach to identify differentially expressed proteins. This technique requires the “tagging” in N-terminal position of previously digested protein samples. Each experimental group is tagged with a different reporter, then samples are intermixed, separated through LC, and analyzed with MS–MS. The N-terminal reporters are then ionized and relative-quantified. A fundamental disadvantage of this tool is the high cost due to the tagging process and the powerful spectrometers that are necessary [119]. Using this technique, a series of cardiac tissue proteins from Wistar in acute and chronic epilepsy rat models have been described. Three of these proteins, the receptor for activated protein kinase C1 (RACK1), the aldehyde dehydrogenase 6 family member A1 (ALDH6A1), and the

glycerol uptake/transporter 1 (Hhgl), were identified as playing crucial roles in cardiac injury during epilepsy [120].

4.5. Protein modifications

Proteomics is capable of profiling posttranslational protein modifications such as phosphorylation, acetylation, hydroxylation, methylation, glycosylation, AMPylation, lipidation, ubiquitination, and deamidation, as well as splicing-dependent alterations in protein expression patterns. Since these posttranslational mRNA and protein modifications define unique functional features in a cell phenotype, they are highly relevant and have to be considered in epilepsy research. Spectrophotometry techniques have become very sophisticated in recent times and allow visualizing the posttranslational changes. Mass spectrometry techniques can be used to profile posttranslational modified (PTM) peptides in a digested sample. The PTMScan® technology combines antibody enrichment of PTM-containing peptides with HPLC–MS/MS and allows identification and quantification of hundreds to thousands of even the lowest abundance peptides (Fig. 4D). All in all, this technique provides a more focused approach to peptide enrichment than other strategies and makes possible to determine novel protein sites that are phosphorylated, ubiquitinated, acetylated, methylated, or protease cleaved (cell signaling technology- <https://www.cellsignal.com/contents/simplifying-proteomics/proteomics>). Independently of the proteomics tools used, all results need to be validated before any potential biomarker could be subjected to further analysis. The most common method for biomarker validation is the immunodetection.

5. Immunodetection

Epilepsy research using rodents to model epilepsy has made significant progress thanks to a variety of techniques that specifically detect and identify antigens (or proteins) in epileptic samples. Common methods of immunological detection in epilepsy research are western blot analysis, immunostaining, and protein microarrays. All of them are based on the existence of specific antibodies (Fig. 4E).

5.1. Western blot analysis

This technique – also known as electroblotting [121] or immunoblotting [122] – is a rapid and sensitive assay that combines the resolution of gel electrophoresis and the principles of immunological recognition of an antigen [123]. By using a western blot analysis, researchers are able to separate and identify specific proteins from a mixture of proteins extracted from complex biological samples such as serum, cells, or tissue. In this technique, a mixture of proteins is separated based on molecular weight, and by protein type, through gel electrophoresis. The results are then transferred to a membrane producing a band for each protein. The membrane is then incubated with labeled

Notes to table 1

Epilepsy subtypes: AbE—absence epilepsy; CStE — convulsive status epilepticus; MTLE — mesiotemporal lobe epilepsy; RefE — refractory epilepsy; StE — status epilepticus; TLE — temporal lobe epilepsy.

Abbreviations: AAK1 — AP2-associated protein kinase 1; ACBP — Acyl-CoA-binding protein; ACO — aconitate hydratase; ACTA1 — alpha actin-1; ACTA2 — alpha actin-2; ACTB — beta actin; ALDH — Aldehyde dehydrogenase; AK1 — Adenylate kinase isoenzyme 1; ALDOA — Aldose A; ALK — Anaplastic lymphoma kinase; ANXA6 — Protein disulfideisomerase A6 precursor; APOA1 — apolipoprotein A1; APOE — Apolipoprotein E; ARHGDI A — Rho GDP — Dissociation Inhibitor Alpha; ATP5F1B — ATP synthase subunit beta; ATP5F1D-ATP Synthase F1 Subunit Delta; ATP5H — ATP synthase subunit D; ATP6V1E1 — ATPase H + Transporting V1 Subunit E1; BAIA2 — Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2; CA2 — carbonic anhydrase 2; CAH5A — Carbonic anhydrase 5A; CAPG — Macrophage-capping protein; CD28 — CD28 Antigen; CFL1 — Cofilin 1; CH10 — 10 kDa heat shock protein; CK — creatine kinase; CLU — Clusterin; COF1 — Cofilin-1; COX2 — cyclooxygenase-2; COX6B1 — Cytochrome c oxidase subunit VIb isoform 1; cPLA(2)α — group IVA cytosolic phospholipase α2; CRYAB — crystallin, alpha B; CRYM — crystallin, mu; CTSD — cathepsin D; CTSZ — Cathepsin Z; CTTN — Src substrate cortactin; CX6B1 — Cytochrome c oxidase subunit VIb isoform 1; DDT — D-Dopachrome Tautomerase; DHPR — dihydropyridine reductase; DHRS1 — Dehydrogenase/reductase SDR family member 1; DNM3 — Dynamin 3; DPYSL2 — dihydropyrimidinase-related protein-2; ENO1 — enolase 1; ENO2 — enolase 2; ENOSF1 — Enolase Superfamily Member 1; EZR — ezrin; FABP7 — Fatty acid-binding protein; FAS — Fas Cell Surface Death Receptor; FBA — fructose-bisphosphate aldolase A; FLNA — Filamin A; GADPH — glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GAERS — Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg; GDNF — Glial cell line derived neurotrophic factor; GFAP — Glial fibrillary acidic protein; GLOD4 — Glyoxalase domain-containing protein 4; GLUD1 — Glutamate dehydrogenase 1; GRHPR — glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase; GSTM1 — Glutathione S-Transferase Mu 1; GUK1 — Guanylate kinase 1; HBA1/2 — Hemoglobin subunit alpha-1/2; HBB — Hemoglobin subunit beta 1; HEXB — Beta-hexosaminidase subunit beta; HMGB1 — High Mobility Group Box 1; HNRNP2B1 — Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1; HNRNPDL — Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein D Like; HNRNP2B2 — Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2; HOMER2 — Homer Scaffold Protein 2; HSP27 — heat shock protein-27; HSP90AA1 — Heat shock protein HSP 90-beta; HSP90B1 — HSPA1A- Heat shock 70 kDa.

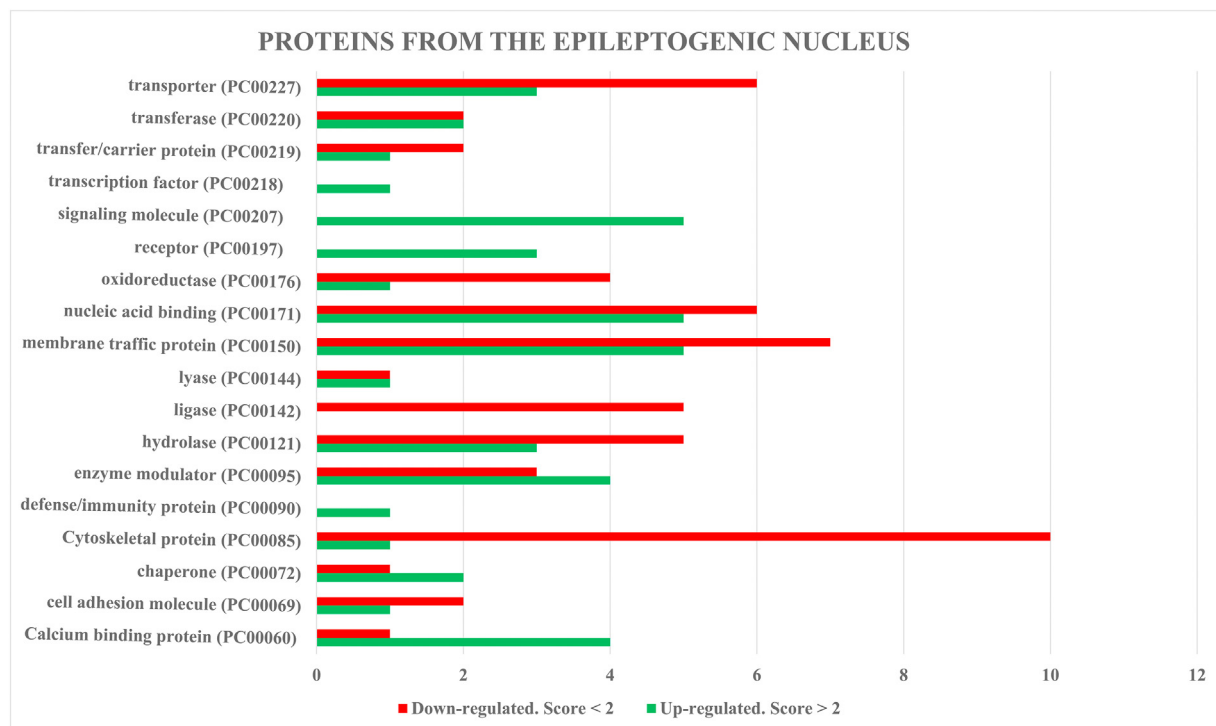


Fig. 3. Variation of protein expression between GASH/Sal and control animals in the epileptogenic nucleus (inferior colliculus) and the corresponding categorical classification. The plot displays proteins with ± 2 -fold change compared with controls. https://www.ebi.ac.uk/reference_proteomes

antibodies specific to the protein of interest. Since the thickness of the band corresponds to the amount of protein present, western blot analysis provides a relative comparison of protein levels, but not an absolute measure of quantity [123]. Detection, specificity, and sensitivity are crucial for accurate and quantitative analysis in western blotting that strongly depends on the quality of the available antibodies.

5.2. Immunostaining

Together with the western blot analysis, immunostaining is one of the gold standard protein analytical techniques that selectively identify proteins in cells (so-called immunocytochemistry) or in tissue sections (so-called immunohistochemistry) by exploiting the principles of immunological recognition of an antigen. Both immunostaining techniques are powerful microscopy-based techniques for the detection of specific proteins within individual cells and tissue samples and, hence, add valuable information about the immunolocalization and distribution of a target protein in cell compartments and tissues. Immunostaining is developed following a variety of protocols that involve exposure of fixed cells or tissues to primary antibodies directed against one or more proteins of interest. Bounded primary antibodies are then detected directly if they are conjugated to a label (direct detection method) or using commercially available secondary antibodies directed against the invariant portion of the primary antibody (indirect detection method). Two principal methodologies exist to visualize antigen-antibody complexes: immunofluorescence using fluorophore-conjugated antibodies or chemiluminescence using antibodies coupled to horseradish peroxidase [124]. A good example of immunohistochemistry applied in rodent models of epilepsy is the study of the association between activation immediate early genes and seizure activity. The WAR and GASH/Sal are two genetically epileptic prone rodents that showed overexpression of the immediate-early growth response genes (*Egr1*, *Egr2*, and *Egr3*) in the IC (the epileptogenic focus) after an ictal event [11]. López-López et al. [11] used immunohistochemistry to complement the results of RT-qPCR analysis of the *Egr3* gene, determining the

distribution of EGR3 protein in the brain tissue of control and seizure-prone animals. Therefore, comparison between different samples obtained from control and epilepsy-prone rodents is of paramount importance and, hence, needs to be based on objective data in order to obtain accurate and reproducible results. As in western blot analysis, the quantitative immunostaining performed on tissue sections by means of digital photomicroscopy and image analysis can be used to estimate the number or density of immunopositive structures within the tissue sample as well as the immunostaining intensity across the region of interest. To compare multiple specimens, immunostaining and image acquisition should be performed in parallel for the entire set. Identical reagents and processing should be used, with identical image acquisition settings and exposure times. The most commonly used image-processing analysis software for quantitative immunostaining is the Java-based NIH ImageJ software. ImageJ is in the public domain (available at <http://rsb.info.nih.gov/nih-image>), supports a wide image formats, and can be expanded with the installation of more than 150 plugins that are additional tools for facilitating scientific image analysis including quantitative immunostaining. Fig. 5 shows an example of semiquantitative immunostaining analysis of transthyretin (TTR) protein using the ImageJ software. Mutant forms and overexpression of *Ttr* gene in brain tissue have been associated with seizure as well as abnormalities in behavior and movement [125]. Also, overexpression of *Ttr* could be directly related with membrane depolarization [126] and loss of GABA receptor activity [127] and thereby increasing the risk of seizures. As is the case of immediate early genes, an overexpression of *Ttr* gene might contribute to the altered brain gene expression profiles associated with seizure susceptibility in genetic rodent models of epilepsy. Since a gap between the mRNA and protein levels exists because of various levels of regulation, the results obtained by gene expression (RT-qPCR) need to be correlated with the protein levels. The western blot and immunostaining analysis in the IC of the GASH/Sal model showed that TTR protein levels are higher in the GASH/Sal model than in age-matched controls, confirming the alterations in the gene expression profiles.

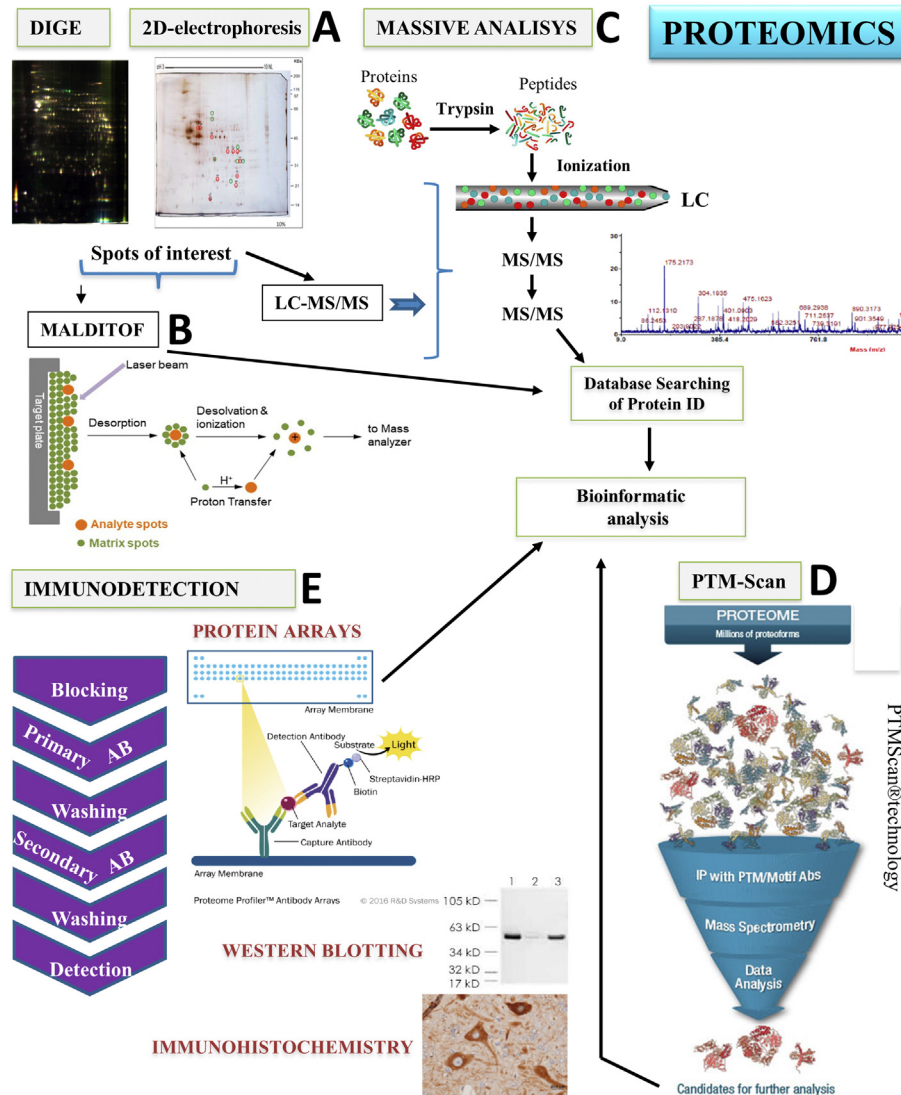


Fig. 4. Experimental workflow for proteomic studies. A. Types of bidimensional electrophoresis. B. MALDI-TOF mass spectrometry (image from <https://www.creative-proteomics.com/technology/maldi-tof-mass-spectrometry.htm> [112]). C. Conventional massive protein analysis: digestion of protein with trypsin, separation of peptides by LC followed by tandem mass spectrometry. D. PTM-Scan. Posttranslational modifications (image obtained from https://www.cellsignal.com/content/_/simplifying-proteomics/proteomics). E. Immunodetection: Steps for protein immunodetection (wide arrows) and different techniques based on antigen–antibody recognition: Protein arrays (reproduced with permission of R&D Systems), Western blotting and immunohistochemistry. Abbreviation: AB – antibody; DIGE – Fluorescence Difference Gel Electrophoresis; ID – Identity; LC – liquid chromatography; MS – Mass spectrometry; PTM – posttranslational modified.

5.3. Protein microarrays

Protein microarray is a relatively new technology used for the characterization of large numbers of proteins in parallel [128]. Protein microarrays include three classes: analytical, functional, and reverse-phase protein microarrays that provide a powerful tool in quantifying and profiling proteins. It is also a high-throughput method for tracking the interactions and activities of proteins as well as determining their function and protein posttranslational modifications [129,130]. There are multiple protein microarrays designed to identify a large number of proteins as well as specific protein microarrays that are used for diagnostic assays in humans. Despite the considerable investments made by several companies, there are few commercial protein microarrays for rodents. The few protein microarrays available so far are aimed at the identification of signaling pathways (Mouse AKT Pathway Phosphorylation Array C1, # AAH-AKT-1-2, RayBiotech, Inc.) or specific proteins, such as inflammatory proteins. Among the latter, it should be noted that the cytokine array is used for the parallel determination of the

relative levels of selected cytokines and chemokines (Mouse Cytokine Array# ARY006, R&D Systems, Inc.; mouse Th1/Th2/Th17 cytometric bead array kit, BD Biosciences, San Diego, CA, USA). This type of protein microarrays is very useful to determine modifications of certain interleukins associated with seizures as well as the effects of different anticonvulsant compounds [131].

6. Crosslinking

It is noteworthy to review the functional classification of genes or proteins involved in epilepsy. The gene ontology classification of cellular components, biological processes, and molecular functions has been used for functional classification by the majority of authors. Four functional groups have been described so far as the most representative in epilepsy (neuronal signaling, immunity/inflammation, transcriptional regulation, and signal transduction), and two pathways showed enrichment: the chemokine signaling pathway and Toll-like receptor signaling pathway. Moreover, additional processes and pathways that are linked

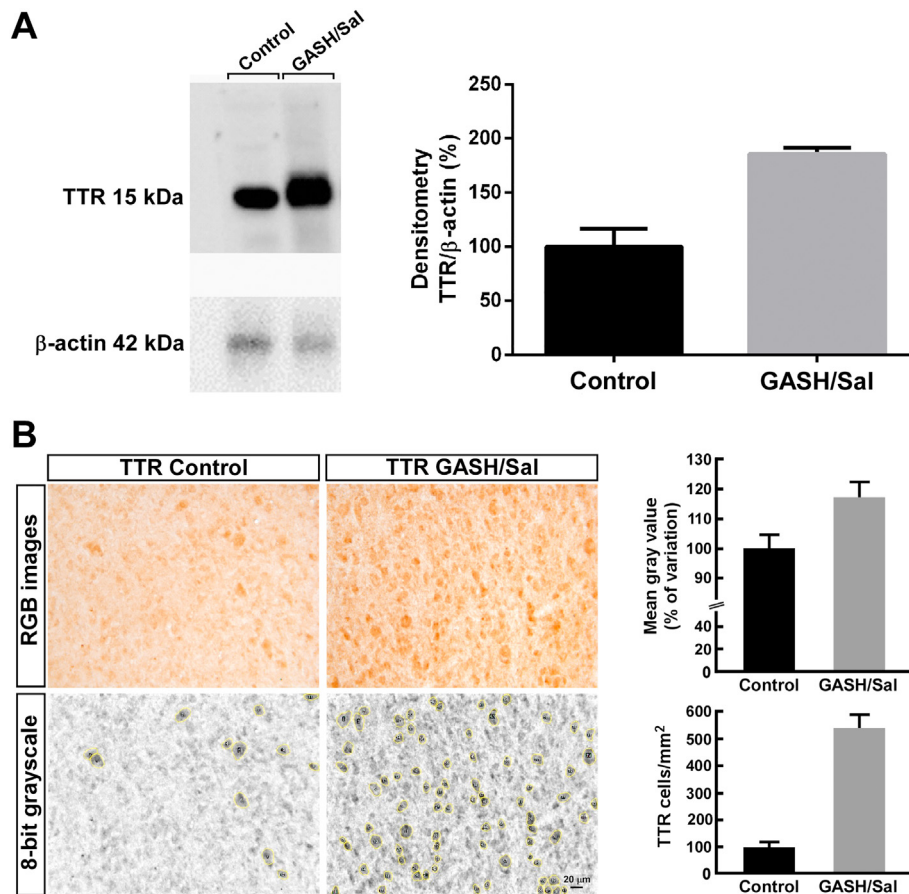


Fig. 5. Semiquantitative immunostaining analysis of transthyretin (TTR) protein in the inferior colliculus of the GASH/Sal. **A.** Western blot analysis of TTR protein with antibodies to TTR and β -actin. The western blot band intensities were measured with ImageJ software. The histogram shows a semiquantitative analysis of TTR protein levels, which were normalized to β -actin levels. The intensity (mean $\pm$ standard error) was normalized to wild-type values (control), which were set equal to 100%. Note that protein levels of TTR differed between control and GASH/Sal animals. **B.** High-magnification photomicrographs illustrating TTR immunoreactivity in the central nucleus of the IC (scale bar represents 20 μ m and is the same for all panels). The RGB-color images corresponding to control and GASH/Sal animals were converted to 8-bit images that contained a grayscale of pixel intensities ranging from 0 (black) to 255 (white). The densitometric procedure for the evaluation of TTR immunostaining was performed by using ImageJ software. The upper histogram shows percentages of variation (mean $\pm$ standard error) for mean gray value of the immunostaining that were used as an indicator of changes in protein levels. The lower histogram shows the number of TTR-immunolabeled cells per mm². Note the increased density of immunostained cells in the GASH/Sal compared with the control animal.

to these two pathways include ubiquitin-mediated proteolysis, complement cascade, JAK-STAT signaling pathway, cellular growth and differentiation, cell survival, migration, apoptosis, Reactive Oxygen Species (ROS) production, Nitric oxide (NO) induction, MAPK signaling pathway, leukocyte transendothelial migration, and regulation of cytoskeleton system [11,66]. There are several computer-based tools to establish relationships between differentially expressed genes or proteins with epilepsy. These web interfaces integrate database that is used to determine co-occurrence between different annotations, identifying those that are statistically significant. These interactions are of special interest for proteins, because most of them work in conjunction with other proteins. This is especially useful to determine potential associations in cellular signaling pathways. Among the multiple tools on the web, Table 2 shows the most used to search functional or structural associations between genes, proteins, and metabolic pathways.

7. Conclusions

Advances in molecular tools have improved substantially the genomic and proteomic studies on specific genes and proteins associated with epilepsy, allowing comprehensive research of rodent seizure models.

Since genetic variations, gene expression changes, and protein alterations are causes of specific epilepsy phenotypes, the experimental

designs in rodent models of epilepsy should incorporate complementary analysis for verifying results obtained at each stage of the flow information from DNA to RNA to protein levels. To achieve this goal, a good experimental design should be developed with careful consideration for determining the most appropriate approach, taking into account that no one technique is applicable to every set objective, and each has its own strengths and weaknesses.

Development of these research methods and their application to animal model of epilepsy might led to a rapid increase in our understanding of the complex mechanisms underlying epileptogenesis and seizure generation in the immediate future. In this regard, comparative molecular approaches to determine the differences between rodent seizure models and their wild-type counterparts provide valuable information on molecular events that contribute to seizure susceptibility and regulation of neuronal excitability.

The rapid identification of these molecular alterations, as facilitated by genomic and proteomic technologies, will shed light not only on the molecular pathways mediating epileptogenesis, but also on the development of novel applications for the diagnosis, prognosis, and treatment of seizures.

Declaration of competing interest

The authors declare no conflicts of financial and nonfinancial interests.

Table 2

Web-based interfaces and database collections used to query functional and structural associations between genes, proteins and metabolic pathways.

Gene/Protein interactions	Functional analysis.
http://akt.ucsf.edu/ http://biocyc.org/ http://david.abcc.ncifcrf.gov/ http://pid.nci.nih.gov/ http://string-db.org http://www.csuchico.edu/ge/ http://www.cuny.edu/pathways http://www.elsevier.com/online-tools/pathway-studio/biological-database http://www.genecards.org http://www.genome.jp/kegg/ http://mimi.ncibi.org/MimiWeb/main-page.jsp https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ https://www.wikigenes.org	http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/ http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/ http://genecodis.cnb.csic.es http://gtlinker.cnb.csic.es/ http://mimi.ncibi.org/MimiWeb/main-page.jsp http://www.pantherdb.org/ https://pathcards.genecards.org/ https://www.ensembl.org/Multi/Search/New?db=core
Pathological phenotypes https://ve.genecards.org/#input https://discovery.lifemapsc.com/gene-expression-signals/high-throughput-disease http://www.informatics.jax.org/humanDisease.shtml https://www.malacards.org/ https://www.genome.jp/kegg/pathway.html#disease	pathways http://higherend.colorado.gov/Academics/Transfers/gtPathways/ http://www.cuny.edu/pathways http://www.ebi.ac.uk/biomodels-main/BIOMD0000000286 http://www.elsevier.com/online-tools/pathway-studio/biological-database http://www.genemania.org http://www.genmapp.org/go_elite/ https://pathcards.genecards.org/ https://www.genome.jp/kegg/tool/map_pathway1.html https://www.uniprot.org/

Acknowledgments

This study was supported by the Regional Government of Castilla and León [SA070P17 (IP-López DE), and #GRS 1838/A/18 (IP-Gonçalves)] and by SAF2016-78898-C2-2R (IP- Merchán).

References

- [1] World Health Organization (WHO), Updated 2017. Available in: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/>
- [2] Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhot L, et al. ILAE classification of the epilepsies: position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia* 2017;58:512–21. <https://doi.org/10.1111/epi.13709>.
- [3] Steinlein OK. Genetics and epilepsy. *Dialogs Clin Neurosci* 2008;10:29–38.
- [4] Caraballo RH, Dalla Bernardina B. *Handb Clin Neurol*. 2013;111:579–89. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52,891-9.00060-9>.
- [5] Pitkänen A, Ekolle N, Ndode-Ekane X, Lapinlampi N, Puhakka N. Epilepsy biomarkers – toward etiology and pathology specificity. *Neurobiol Dis* 2019;123:42–58. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.05.007>.
- [6] Kandravicius L, Balista P, Lopes-Aguiar C, Ruggiero R, Umeoka E, García-Cairasco N, et al. Animal models of epilepsy: use and limitations. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2014;10:1693. <https://doi.org/10.2147/NDT.S50371>.
- [7] Muñoz LJ, Carballo-Gautam MM, Yanowsky K, García-Atarés N, López DE. The genetic audiogenic seizure hamster from Salamanca: the GASH:Sal. *Epilepsy Behav* 2017;71:181–92. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2016.03.002>.
- [8] Ross K, Coleman J. Developmental and genetic audiogenic seizure models: behavior and biological substrates. *Neurosci Biobehav Rev* 2000;24:639–53. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(00\)00029-4](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(00)00029-4).
- [9] Coenen AML, Van Luijckelaar ELJM. The WAG/Rij rat model for absence epilepsy: age and sex factors. *Epilepsy Res* 1987;1:297–301. [https://doi.org/10.1016/0920-1211\(87\)90005-2](https://doi.org/10.1016/0920-1211(87)90005-2).
- [10] Damasceno S, de Menezes NB, Rocha C de S, de Matos AHB, Vieira AS, Moraes MFD, et al. Transcriptome of the Wistar audiogenic rat (WAR) strain following audiogenic seizures. *Epilepsy Res* 2018;147:22–31. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2018.08.010>.
- [11] López-López D, Gómez-Nieto R, Herrero-Turrión MJ, García-Cairasco N, Sánchez-Benito D, Ludeña MD, et al. Overexpression of the immediate-early genes *Egr1*, *Egr2*, and *Egr3* in two strains of rodents susceptible to audiogenic seizures. *Epilepsy Behav* 2017;71:226–37. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.12.020>.
- [12] Wang J, Lin Z, Liu L, Xu H, Shi Y, Yi Y, et al. Epilepsy-associated genes. *Seizure* 2017;44:11–20. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2016.11.030>.
- [13] Kearney H, Byrne S, Cavalleri GL, Delanty N. Tackling epilepsy with high-definition precision medicine: a review. *JAMA Neurol* 2019. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2019.2384>.
- [14] Weber YG, Lerche H. Genetic mechanisms in idiopathic epilepsies. *Dev Med Child Neurol* 2008;50:648–54. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8749.2008.03058.x>.
- [15] Butler KM, Moody OA, Schuler E, Coryell J, Alexander JJ, Jenkins A, et al. De novo variants in *GABRA2* and *GABRA5* alter receptor function and contribute to early-onset epilepsy. *Brain* 2018;141(8):2392–405. <https://doi.org/10.1093/brain/awy171>.
- [16] Helbig I, Lowenstein DH. Genetics of the epilepsies. *Curr Opin Neurol* 2013;26:179–85. <https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e32835ee6ff>.
- [17] Heron SE, Grinton BE, Kivity S, Afawi Z, Zuberi SM, Hughes JN, et al. PRRT2 mutations cause benign familial infantile epilepsy and infantile convulsions with choreoathetosis syndrome. *Am J Hum Genet* 2012;90:152–60. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.12.003>.
- [18] Saitsu H, Kato M, Mizuguchi T, Hamada K, Osaka H, Tohyama J, et al. De novo mutations in the gene encoding STXBP1 (MUNC18-1) cause early infantile epileptic encephalopathy. *Nat Genet* 2008;40:782–8. <https://doi.org/10.1038/ng.150>.
- [19] Olson H, Poduri A. CDKL5 mutations in early onset epilepsy: case report and review of the literature. *J Pediatr Epilepsy* 2012;1:151–9.
- [20] Marini C, Mei D, Parmeggiani L, Norci V, Calado E, Ferrari A, et al. Protocadherin 19 mutations in girls with infantile-onset epilepsy. *Neurology* 2010;75:646–53. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181ed9e67>.
- [21] Olivetti PR, Noebels JL. Interneuron, interrupted: molecular pathogenesis of ARX mutations and X-linked infantile spasms. *Curr Opin Neurobiol* 2012;22:859–65. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2012.04.006>.
- [22] Shen J, Gilmore EC, Marshall CA, Haddadin M, Reynolds JJ, Eyaid W, et al. Mutations in PNKP cause microcephaly, seizures and defects in DNA repair. *Nat Genet* 2010;42:245–9. <https://doi.org/10.1038/ng.526>.
- [23] Molinari F, Kaminska A, Fiermonte G, Boddard N, Raas-Rothschild A, Plouin P, et al. Mutations in the mitochondrial glutamate carrier SLC25A22 in neonatal epileptic encephalopathy with suppression bursts. *Clin Genet* 2009;76:188–94. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2009.01236.x>.
- [24] Mills PB, Camuzeaux SSM, Footitt EJ, Mills KA, Gissen P, Fisher L, et al. Epilepsy due to PNPO mutations: genotype, environment and treatment affect presentation and outcome. *Brain* 2014;137:1350–60. <https://doi.org/10.1093/brain/awu051>.
- [25] Depaulis A, David O, Charpier S. The genetic absence epilepsy rat from Strasbourg as a model to decipher the neuronal and network mechanisms of generalized idiopathic epilepsies. *J Neurosci Methods* 2016;260:159–74. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2015.05.022>.
- [26] van Luijckelaar G, Zobeiri M. Progress and outlooks in a genetic absence epilepsy model (WAG/Rij). *Curr Med Chem* 2014;21(6):704–21. <https://doi.org/10.2174/0929867320666131119152913>.
- [27] García-Cairasco N, Umeoka EHL, Cortes de Oliveira JA. The Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain and its contributions to epileptology and related comorbidities: history and perspectives. *Epilepsy Behav*. 2017;71(Pt B):250–273. doi: <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2017.04.001>.
- [28] Cunliffe VT. Building a zebrafish toolkit for investigating the pathobiology of epilepsy and identifying new treatments for epileptic seizures. *J Neurosci Methods* 2016;260:91–5. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2015.07.015>.
- [29] Beaudet AL. Which way for genetic-test regulation? Leave test interpretation to specialists. *Nature* 2010;466:816–7. <https://doi.org/10.1038/466816a>.
- [30] Castells-Sarret N, Cueto-González MA, Borreganc M, López-Grondona F, Miró R, Tizzano E, et al. Comparative genomic hybridisation as a first option in genetic diagnosis: 1,000 cases and a cost-benefit analysis. *An Pediatr (Barc)* 2018;89(1):3–11. <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2017.07.011>.
- [31] Mullen SA, Carvill GL, Bellows S, Bayly MA, Berkovic SF, Dibbens LM, et al. Copy number variants are frequent in genetic generalized epilepsy with intellectual disability. *Neurology* 2013;81:1507–14. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182a95829>.
- [32] Hartmann C, von Spiczak S, Suls A, Weckhuysen S, Buyse G, Vilain C, et al. Investigating the genetic basis of fever-associated syndromic epilepsies using copy

- number variation analysis. *Epilepsia* 2015;56:e26–32. <https://doi.org/10.1111/epi.12920>.
- [33] Mefford HC, Muhle H, Ostertag P, von Spiczak S, Buysse K, Baker C, et al. Genome-wide copy number variation in epilepsy: novel susceptibility loci in idiopathic generalized and focal epilepsies. *PLoS Genet* 2010;6:e1000962. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000962>.
- [34] Olson H, Shen Y, Avallone J, Sheidley BR, Pinsky R, Bergin AM, et al. Copy number variation plays an important role in clinical epilepsy. *Ann Neurol* 2014;75:943–58. <https://doi.org/10.1002/ana.24178>.
- [35] Tsuchida N, Nakashima M, Kato M, Heyman E, Inui T, Haginoya K, et al. Detection of copy number variations in epilepsy using exome data. *Clin Genet* 2018;93:577–87. <https://doi.org/10.1111/cge.13144>.
- [36] Casillas-Espinosa PM, Powell KL, Zhu M, Campbell CR, Maia JM, Ren Z, et al. Evaluating whole genome sequence data from the Genetic Absence Epilepsy Rat from Strasbourg and its related non-epileptic strain. *PLoS One* 2017;12(7):e0179924. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179924>.
- [37] Epi4K Consortium, Epilepsy phenome/genome project. De novo mutations in epileptic encephalopathies. *Nature* 2013; 12:501(7466):217–21 doi: <https://doi.org/10.1038/nature12439>.
- [38] Traynelis J, Silk M, Wang Q, Berkovic SF, Liu L, Ascher DB, et al. Optimizing genomic medicine in epilepsy through a gene-customized approach to missense variant interpretation. *Genome Res* 2017;27(10):1715–29. <https://doi.org/10.1101/g.226589.117>.
- [39] Allen AS, Berkovic SF, Cossette P, Delanty N, Dlugos D, Eichler EE, et al. De novo mutations in epileptic encephalopathies. *Nature* 2013;501:217–21. <https://doi.org/10.1038/nature12439>.
- [40] Wingett SW, Andrews S. FastQ Screen: a tool for multi-genome mapping and quality control. *F1000Res*. 2018;7:1338. doi: [10.12688/f1000research.15931.2.eCollection](https://doi.org/10.12688/f1000research.15931.2.eCollection).
- [41] Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 2012;19:455–77. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>.
- [42] Alkan C, Coe BP, Eichler EE. Genome structural variation discovery and genotyping. *Nat Rev Genet* 2011;12:363–76. <https://doi.org/10.1038/nrg2958>.
- [43] Darling AE, Mau B, Blattner FR, Perna NT. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Res* 2004;14(7):1394–403. <https://doi.org/10.1101/g.2289704>.
- [44] Layer RM, Chiang C, Quinlan AR, Hall IM. LUMPY: a probabilistic framework for structural variant discovery. *Genome Biol* 2014;15:R84. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>.
- [45] Musunuru K, Pirruccello JP, Do R, Peloso GM, Guiducci C, Sougnez C, et al. Exome sequencing, ANGPTL3 mutations, and familial combined hypolipidemia. *N Engl J Med* 2010;363:2220–7. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1002926>.
- [46] Foo J, Liu J, Tan E. Whole-genome and whole-exome sequencing in neurological diseases. *Nat Rev Neurol* 2012;8:508–17. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.148>.
- [47] Handel AE, Disanto G, Ramagopalan SV. Next-generation sequencing in understanding complex neurological disease. *Expert Rev Neurother* 2013;13:215–27. <https://doi.org/10.1586/ern.12.165>.
- [48] Michaud JL, Lachance M, Hamdan FF, Carmant L, Lortie A, Diadori P, et al. The genetic landscape of infantile spasms. *Hum Mol Genet* 2014;23:4846–58. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu199>.
- [49] Kobow K, Blümcke I. The methylation hypothesis: do epigenetic chromatin modifications play a role in epileptogenesis? *Epilepsia* 2011;52(Suppl. 4):15–9. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.03145.x>.
- [50] Kobow K, Daspi A, Hari Krishnan KN, Kiese K, Ziemann M, Khurana I, et al. Deep sequencing reveals increased DNA methylation in chronic rat epilepsy. *Acta Neuropathol* 2013;126(5):741–56. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1168-8>.
- [51] Buiting K, Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet* 2010;154C:365–76. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.30273>.
- [52] Weksberg R. Imprinted genes and human disease. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet* 2010;154C:317–20. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.30268>.
- [53] Subhash S, Kanduri M. Comprehensive DNA methylation analysis using a methyl-CpG-binding domain capture-based method in chronic lymphocytic leukemia patients. *J Vis Exp* 2017;124:e55773. <https://doi.org/10.3791/55773>.
- [54] Debski DJ, Pitkanen A, Puhakka N, Bot AM, Khurana I, Hari Krishnan KN, et al. Etiology matters—genomic DNA methylation patterns in three rat models of acquired epilepsy. *Sci Rep* 2016;6(6):25668. <https://doi.org/10.1038/srep25668>.
- [55] Kiese K, Jablonski J, Hackenbrach J, Wrosch JK, Groemer TW, Kornhuber J, et al. Epigenetic control of epilepsy target genes contributes to a cellular memory of epileptogenesis in cultured rat hippocampal neurons. *Acta Neuropathol Commun* 2017;31(5(1)):79. <https://doi.org/10.1186/s40478-017-0485-x>.
- [56] Crosio C, Heitz E, Allis CD, Borrelli E, Sassone-Corsi P. Chromatin remodeling and neuronal response: multiple signaling pathways induce specific histone H3 modifications and early gene expression in hippocampal neurons. *J Cell Sci* 2003;116(Pt 24):4905–14. <https://doi.org/10.1242/jcs.00804>.
- [57] Huang Y, Doherty JJ, Dingledine R. Altered histone acetylation at glutamate receptor 2 and brain-derived neurotrophic factor genes is an early event triggered by status epilepticus. *J Neurosci* 2002;22(19):8422–8. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-19-08422.2002>.
- [58] Tsankova NP, Kumar A, Nestler EJ. Histone modifications at gene promoter regions in rat hippocampus after acute and chronic electroconvulsive seizures. *J Neurosci* 2004;24(24):5603–10. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0589-04.2004>.
- [59] Hoffmann K, Czapp M, Löscher W. Increase in antiepileptic efficacy during prolonged treatment with valproic acid: role of inhibition of histone deacetylases? *Epilepsy Res* 2008;81(2–3):107–13. <https://doi.org/10.1016/j.epilepsyres.2008.04.019>.
- [60] Younus I, Reddy DS. Epigenetic interventions for epileptogenesis: a new frontier for curing epilepsy. *Pharmacol Ther* 2017;177:108–22. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.03.002>.
- [61] Wang YY, Smith P, Murphy M, Cook M. Global expression profiling in epileptogenesis: does it add to the confusion? *Brain Pathol* 2010;20:1–16. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2008.00254.x>.
- [62] Jayapal M, Melendez AJ. DNA microarray technology for target identification and validation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006;33:496–503. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2006.04398.x>.
- [63] Lubeck E, Cai L. Single-cell systems biology by super-resolution imaging and combinatorial labeling. *Nat Methods* 2012;9:743–8. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2069>.
- [64] Ståhl PL, Salmén F, Vickovic S, Lundmark A, Navarro JF, Magnusson J, et al. Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics. *Science* 2016;353(6353):78–82. <https://doi.org/10.1126/science.12403>.
- [65] Nygaard V, Hovig E. Options available for profiling small samples: a review of sample amplification technology when combined with microarray profiling. *Nucleic Acids Res* 2006;34(3):996–1014. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj499>.
- [66] Sharma A. Genome-wide expression analysis in epilepsy: a synthetic review. *Curr Top Med Chem* 2012;12:1008–32. <https://doi.org/10.2174/156802612800229189>.
- [67] Mirza N, Vasieva O, Marson AG, Pirmohamed M. Exploring the genomic basis of pharmacoresistance in epilepsy: an integrative analysis of large-scale gene expression profiling studies on brain tissue from epilepsy surgery. *Hum Mol Genet* 2011;20:4381–94. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr365>.
- [68] Dingledine R, Coulter DA, Fritsch B, Gorter JA, Lelutiu N, McNamara J, et al. Transcriptional profile of hippocampal dentate granule cells in four rat epilepsy models. *Sci Data* 2017;4:170061. <https://doi.org/10.1038/sdata.2017.61>.
- [69] Floriano-Sánchez E, Brindis F, Ortega-Cuellar D, Ignacio-Mejía I, Moreno-Arriola E, Romero-Morelos P, et al. Differential gene expression profile induced by valproic acid (VPA) in pediatric epileptic patients. *Genes (Basel)* 2018;9:328. <https://doi.org/10.3390/genes9070328>.
- [70] Han C, Zhao X, Liu Y, Wang K, Chen N, Hu W, et al. Gene expression profiling of two epilepsy models reveals the ECM/integrin signaling pathway is involved in epileptogenesis. *Neuroscience* 2019;396:187–99. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.10.021>.
- [71] He K, Xiao W, Lv W. Comprehensive identification of essential pathways and transcription factors related to epilepsy by gene set enrichment analysis on microarray datasets. *Int J Mol Med* 2014;34:715–24. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.1843>.
- [72] Lukasiuk K, Pitkanen A. Large-scale analysis of gene expression in epilepsy research: is synthesis already possible? *Neurochem Res* 2004;29:1169–78. <https://doi.org/10.1023/B:NERE.0000023604.91584.6c>.
- [73] Lukasiuk K, Dabrowski M, Adach A, Pitkanen A. Epileptogenesis-related genes revisited. *Prog Brain Res* 2006;158:223–41. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(06\)58011-2](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(06)58011-2).
- [74] Pitkanen A, Lukasiuk K. Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets. *Lancet Neurol* 2011;10:173–86. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70310-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70310-0).
- [75] Rogic S, Pavlidis P. Meta-analysis of kindling-induced gene expression changes in the rat hippocampus. *Front Neurosci* 2009;3:1–10. <https://doi.org/10.3389/neuro.15.001.2009>.
- [76] Salman MM, Sheilabi MA, Bhattacharyya D, Kitchen P, Conner AC, Bill RM, et al. Transcriptome analysis suggests a role for the differential expression of cerebral aquaporins and the MAPK signalling pathway in human temporal lobe epilepsy. *Eur J Neurosci* 2017;46:2121–32. <https://doi.org/10.1111/ejn.13652>.
- [77] Theilhaber J, Rakhade SN, Sudhalter J, Kothari N, Klein P, Pollard J, et al. Gene expression profiling of a hypoxic seizure model of epilepsy suggests a role for mTOR and Wnt signaling in epileptogenesis. *PLoS One* 2013;8:e74428. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074428>.
- [78] Venugopal AK, Kumar GSS, Mahadevan A, Selvan N. Transcriptomic profiling of medial temporal lobe epilepsy. *J Proteomics Bioinform* 2012;05:1–18. <https://doi.org/10.4172/jpb.1000210>.
- [79] von Deimling M, Häslér R, Steinbach V, Holterhus P, von Spiczak S, Stephani U, et al. Gene expression analysis in untreated absence epilepsy demonstrates an inconsistent pattern. *Epilepsy Res* 2017;132:84–90. <https://doi.org/10.1016/j.epilepsyres.2017.02.008>.
- [80] Araújo M, Marques TE, Octacílio-Silva S, Arroxelas-Silva CL, Pereira MG, Peixoto-Santos JE, et al. Identification of microRNAs with dysregulated expression in status epilepticus induced epileptogenesis. *PLoS One* 2016;11(10):e0163855. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163855>.
- [81] Henshall DC, Hamer HM, Pasterkamp RJ, Goldstein DB, Kjems J, Pehn JHM, et al. MicroRNAs in epilepsy: pathophysiology and clinical utility. *Lancet Neurol* 2016;15:1368–76. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)30246-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)30246-0).
- [82] Kaalund SS, Venø MT, Bak M, Møller RS, Laursen H, Madsen F, et al. Aberrant expression of miR-218 and miR-204 in human mesial temporal lobe epilepsy and hippocampal sclerosis—convergence on axonal guidance. *Epilepsia* 2014;55:2017–27. <https://doi.org/10.1111/epi.12839>.
- [83] Meng F, You Y, Liu Z, Liu J, Ding H, Xu R. Neuronal calcium signaling pathways are associated with the development of epilepsy. *Mol Med Rep* 2015;11:196–202. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2756>.
- [84] Srivastava PK, Roncon P, Lukasiuk K, Gorter JA, Aronica E, Pitkanen A, et al. Meta-analysis of microRNAs dysregulated in the hippocampal dentate gyrus of animal models of epilepsy. *Eneuro* 2017;4. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0152-17.2017>.
- [85] Merelli A, Rodríguez JCG, Folch J, Regueiro MR, Camins A, Lazarowski A. Understanding the role of hypoxia inducible factor during neurodegeneration for new

- therapeutics opportunities. *Curr Neuropharmacol* 2018;16(10):1484–98. <https://doi.org/10.2174/1570159X16666180110130253>.
- [86] Rhodes DR, Barrette TR, Rubin MA, Ghosh D, Chinnaiyan AM. Meta-analysis of microarrays: interstudy validation of gene expression profiles reveals pathway dysregulation in prostate cancer 1. *Cancer Res* 2002;62:4427–33.
- [87] Dong X, You Y, Wu JQ. Building an RNA sequencing transcriptome of the central nervous system. *Neurosci* 2016;22:579–92. <https://doi.org/10.1177/1073858415610541>.
- [88] Hrdlickova R, Toloue M, Tian B. RNA-Seq methods for transcriptome analysis. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2017;8:e1364. <https://doi.org/10.1002/wrna.1364>.
- [89] Bosco DB, Zheng J, Xu Z, Peng J, Eyo UB, Tang K, et al. RNAseq analysis of hippocampal microglia after kainic acid-induced seizures. *Mol Brain* 2018;11:34. <https://doi.org/10.1186/s13041-018-0376-5>.
- [90] Bruggeman L, Sturgeon ML, Martin RM, Grossbach AJ, Nagahama Y, Zhang A, et al. Drug repositioning in epilepsy reveals novel antiseizure candidates. *Ann Clin Transl Neurol* 2018. <https://doi.org/10.1002/actn.3.703>.
- [91] Dixit AB, Banerjee J, Srivastava A, Tripathi M, Sarkar C, Kakkar A, et al. RNA-seq analysis of hippocampal tissues reveals novel candidate genes for drug refractory epilepsy in patients with MTL-ES. *Genomics* 2016;107(5):178–88. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2016.04.001>.
- [92] Griffin NG, Wang Y, Hulet CM, Halvorsen M, Cronin KD, Walley NM, et al. Differential gene expression in dentate granule cells in mesial temporal lobe epilepsy with and without hippocampal sclerosis. *Epilepsia* 2016;57:376–85. <https://doi.org/10.1111/epi.13305>.
- [93] Hansen KF, Sakamoto K, Pelz C, Impey S, Obrietan K. Profiling status epilepticus-induced changes in hippocampal RNA expression using high-throughput RNA sequencing. *Sci Rep* 2014;4:6930. <https://doi.org/10.1038/srep06930>.
- [94] Hawkins NA, Kearney JA. Confirmation of an epilepsy modifier locus on mouse chromosome 11 and candidate gene analysis by RNA-Seq. *Genes, Brain Behav* 2012;11:452–60. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2012.00790.x>.
- [95] Miller AR, Hawkins NA, McCollom CE, Kearney JA. Mapping genetic modifiers of survival in a mouse model of Dravet syndrome. *Genes, Brain Behav* 2014;13(2):163–72. <https://doi.org/10.1111/gbb.12099>.
- [96] Jehi L, Yehia L, Peterson C, Niazi F, Busch R, Prayson R, et al. Preliminary report: late seizure recurrence years after epilepsy surgery may be associated with alterations in brain tissue transcriptome. *Epilepsia Open* 2018;3:299–304. <https://doi.org/10.1002/epi4.12119>.
- [97] Shalek AK, Satija R, Shuga J, Trombetta JJ, Gennert D, Lu D, et al. Single-cell RNA-seq reveals dynamic paracrine control of cellular variation. *Nature* 2014;510:363–9. <https://doi.org/10.1038/nature13437>.
- [98] Skene NG, Grant SGN. Identification of vulnerable cell types in major brain disorders using single cell transcriptomes and expression weighted cell type enrichment. *Front Neurosci* 2016;10:1–11. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00016>.
- [99] Lee JH, Daugherty ER, Scheiman J, Kallor R, Yang JL, Ferrante TC, et al. Highly multiplexed subcellular RNA sequencing in situ. *Science* 2014;343(6133):1360–3. <https://doi.org/10.1126/science.1250212>.
- [100] Canales RD, Luo Y, Willey JC, Austermiller B, Barbacioru CC, Boysen C, et al. Evaluation of DNA microarray results with quantitative gene expression platforms. *Nat Biotechnol* 2006;24:1115–22. <https://doi.org/10.1038/nbt1236>.
- [101] Devonshire AS, Sanders R, Wilkes TM, Taylor MS, Foy CA, Huggett JF. Application of next generation qPCR and sequencing platforms to mRNA biomarker analysis. *Methods* 2013;59:89–100. <https://doi.org/10.1016/j.jymeth.2012.07.021>.
- [102] Provenzano M, Mocellin S. Complementary techniques. *Microarray Technol. Cancer Gene Profiling*. New York, NY: Springer New York; 2007. p. 66–73. https://doi.org/10.1007/978-0-387-39978-2_7.
- [103] VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques* 2008;44:619–26. <https://doi.org/10.2144/000112776>.
- [104] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. *Methods* 2001;25(4):402–8.
- [105] Crans RAJ, Janssens J, Daelemans S, Wouters E, Raedt R, Van Dam D, et al. The validation of short interspersed nuclear elements (SINEs) as a RT-qPCR normalization strategy in a rodent model for temporal lobe epilepsy. *PLoS One* 2019;14:e0210567. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210567>.
- [106] Morey JS, Ryan JC, Dolah FM. Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biol Proced Online* 2006;8:175–93. <https://doi.org/10.1251/bpo126>.
- [107] Crosetto N, Bienko M, van Oudenaarden A. Spatially resolved transcriptomics and beyond. *Nat Rev Genet* 2015;16:57–66. <https://doi.org/10.1038/nrg3832>.
- [108] Lein E, Borm LE, Linnarsson S. The promise of spatial transcriptomics for neuroscience in the era of molecular cell typing. *Science* 2017;358(6409):64–9. <https://doi.org/10.1126/science.aan6827>.
- [109] Moor AE, Itzkovitz S. Spatial transcriptomics: paving the way for tissue-level systems biology. *Curr Opin Biotechnol* 2017;46:126–33. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.02.004>.
- [110] Strell C, Hilscher MM, Laxman N, Svedlund J, Wu C, Yokota C, et al. Placing RNA in context and space – methods for spatially resolved transcriptomics. *FEBS J* 2019;286:1468–81. <https://doi.org/10.1111/febs.14435>.
- [111] Lovatt D, Ruble BK, Lee J, Dueck H, Kim TK, Fisher S, et al. Transcriptome in vivo analysis (TIVA) of spatially defined single cells in live tissue. *Nat Methods* 2014;11:190–6. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2804>.
- [112] Creative Proteomics, Recovered May 15, 2019, from <https://www.creative-proteomics.com/technology/maldi-tof-mass-spectrometry.htm>
- [113] Györfi B, Kovács Z, Gulyásy P, Simor A, Völgyi K, Orbán G, et al. Brain protein expression changes in WAG/Rij rats, a genetic rat model of absence epilepsy after peripheral lipopolysaccharide treatment. *Brain Behav Immun* 2014;35:86–95. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.09.001>.
- [114] Fiordelisio T, Jiménez N, Baba S, Shiba K, Hernández-Cruz A. Immunoreactivity to neurofilaments in the rodent anterior pituitary is associated with the expression of α 1A protein subunits of voltage-gated Ca²⁺ channels. *J Neuroendocrinol* 2007;19:870–81. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2007.01596.x>.
- [115] Romá-Mateo C, Aguado C, García-Giménez JL, Ibáñez-Cabellos JS, Seco-Cervera M, Pallardó FV, et al. Increased oxidative stress and impaired antioxidant response in Lafora disease. *Mol Neurobiol* 2015;51:932–46. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8747-0>.
- [116] Mitulović G. New HPLC techniques for proteomics analysis: a short overview of latest developments. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 2015;38(3):390–403. <https://doi.org/10.1080/10826076.2014.941266>.
- [117] Magdeldin S, Moresco JJ, Yamamoto T, Yates JR. Off-line multidimensional liquid chromatography and auto-sampling result in sample loss in LC/LC–MS/MS. *J Proteome Res* 2014;13(8):3826–36. <https://doi.org/10.1021/pr500530e>.
- [118] Thomas PD. PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome Res* 2003;13:2129–41. <https://doi.org/10.1101/g.772403>.
- [119] Jara A, Kopchick JJ. Proteómica: una aproximación integral. *An Pediatr* 2013;78:137–9. <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2012.10.007>.
- [120] Zhang P, Zhang L, Li Y, Zhu S, Zhao M, Ding S, et al. Quantitative proteomic analysis to identify differentially expressed proteins in myocardial infarction by iTRAQ coupled with nano-LC–MS/MS. *J Proteome Res* 2018;17(1):305–14. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00579>.
- [121] Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci* 1979;76:4350–4. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>.
- [122] Burnette WN. “Western Blotting”: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 1981;112:195–203. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90281-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90281-5).
- [123] Mousseau DD, Raghavendra Rao VL. Western blot analysis. In: Boulton AA, Baker GB, Bateson AN, editors. *In vitro neurochemical techniques*. *Neuromethods*, vol 34. Humana Press; 1999.
- [124] Maity B, Sheff D, Fisher RA. Immunostaining. *Methods Cell Biol.*, vol. 113, Elsevier; 2013. p. 81–105. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407239-8.00005-7>.
- [125] Park J-W, Park E-S, Choi EN, Park H, Jung S. Altered brain gene expression profiles associated with the pathogenesis of phenylketonuria in a mouse model. *Clin Chim Acta* 2009;401:90–9. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2008.11.019>.
- [126] Gasperini RJ, Hou X, Parkington H, Coleman H, Klaver DW, Vincent AJ, et al. TRPM8 and Nav1.8 sodium channels are required for transthyretin-induced calcium influx in growth cones of small-diameter TrkA-positive sensory neurons. *Mol Neurodegener* 2011;6:19–30. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-6-19>.
- [127] Zhou L, Tang X, Li X, Bai Y, Buxbaum JN, Chen G. Identification of transthyretin as a novel interacting partner for the δ subunit of GABA_A receptors. *PLoS ONE* 2019;14(1):e0210094. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210094>.
- [128] Melton L. Proteomics in multiplex. *Nature* 2004;429:105–7. <https://doi.org/10.1038/429101a>.
- [129] Sutandy FR, Qian J, Chen C-S, Zhu H. Overview of protein microarrays. *Curr Protoc Protein Sci* 2013;72:27.1.1–27.1.16. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps2701.s72>.
- [130] Talapatra A, Rouse R, Hardiman G. Protein microarrays: challenges and promises. *Pharmacogenomics* 2002;3:527–36. <https://doi.org/10.1517/14622416.3.4.527>.
- [131] Vilela LR, Lima IV, Kunsch EB, Pinto HPP, de Miranda AS, Vieira ÉLM, et al. Anticonvulsant effect of cannabidiol in the pentylenetetrazole model: pharmacological mechanisms, electroencephalographic profile, and brain cytokine levels. *Epilepsy Behav* 2017;75:29–35. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2017.07.014>.
- [132] Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown G, Chao C, Chitipiralla S, et al. ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants. *Nucleic Acids Res* 2016;44(D1):D862–8. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1222>.
- [133] Stenson PD, Ball EV, Mort M, Phillips AD, Shiel JA, Thomas NS, et al. Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Hum Mutat* 2003 Jun;21(6):577–81. <https://doi.org/10.1002/humu.10212>.
- [134] Hauser RM, Henshall DC, Lubin FD. The Epigenetics of Epilepsy and Its Progression. *Neuroscientist* 2018;24(2):186–200. <https://doi.org/10.1177/1073858417705840>.
- [135] van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thérmes C. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet* 2014;30:418–26. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.07.001>.
- [136] Pernot F, Heinrich C, Barbier L, Peinnequin A, Carpentier P, Dhote F, et al. Inflammatory changes during epileptogenesis and spontaneous seizures in a mouse model of mesiotemporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2011;52(12):2315–25. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.03273.x>.
- [137] Danis O, Demir S, Gunel A, Aker RG, Gulcebi M, Onat F, et al. Changes in intracellular protein expression in cortex, thalamus and hippocampus in a genetic rat model of absence epilepsy. *Brain Res Bull* 2011;84(6):381–8. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.02.002>.
- [138] Huang ZL, Zhou Y, Xiao B, Wu J, Wu XM, Yang P, Wu LY. Proteomic screening of postsynaptic density proteins related with temporal lobe epilepsy. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2008;88(45):3205–9. <https://doi.org/10.3321/j.issn:0376-2491.2008.45.010>.
- [139] Jiang W, Du B, Chi Z, Ma L, Wang S, Zhang X, et al. Preliminary explorations of the role of mitochondrial proteins in refractory epilepsy: some findings from comparative proteomics. *J Neurosci Res* 2007;85(14):3160–70. <https://doi.org/10.1002/jnr.21384>.
- [140] Greene ND, Bamidele A, Choy M, de Castro SC, Wait R, Leung KY, et al. Proteome changes associated with hippocampal MRI abnormalities in the lithium

- pilocarpine-induced model of convulsive status epilepticus. *Proteomics* 2007;7(8): 1336–44. <https://doi.org/10.1002/pmic.200601027>.
- [141] Junker H, Spate K, Suofu Y, Walther R, Schwarz G, Kammer W, et al. Proteomic identification of the involvement of the mitochondrial rieske protein in epilepsy. *Epilepsia* 2005;46(3):339–43. <https://doi.org/10.1111/j.0013-9580.2005.46904.x>.
- [142] Walker A, Russmann V, Deeg CA, von Toerne C, Kleinwort KJH, Szober C, et al. Proteomic profiling of epileptogenesis in a rat model: Focus on inflammation. *Brain Behav Immun* 2016;53:138–58. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.12.007>.
- [143] Bitsika V, Duveau V, Simon-Areces J, Mullen W, Roucard C, Makridaki M, et al. High-Throughput LC-MS/MS Proteomic Analysis of a Mouse Model of Mesiotemporal Lobe Epilepsy Predicts Microglial Activation Underlying Disease Development. *J Proteome Res* 2016;15(5):1546–62. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00003>.
- [144] Liu X, Yang J, Chen L, Zhang Y, Yang M. Comparative proteomics and correlated signaling network of rat hippocampus in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy 2008:582–603. doi:<https://doi.org/10.1002/pmic.200700514>
- [145] Li A, Choi YS, Dziema H, Cao R, Cho HY, Jung YJ, et al. Own-regulated of the epileptic dentate gyrus. *Brain Pathol* 2010;20(6):1077–89. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2010.00414.x>.
- [146] Wu L, Peng J, Wei C, Liu G. Characterization , using comparative proteomics , of differentially expressed proteins in the hippocampus of the mesial temporal lobe of epileptic rats following treatment with valproate 2011:221–38. doi:<https://doi.org/10.1007/s00726-010-0638-8>.