



MÁSTER UNIVERSITARIO EN NEUROCIENCIAS RD 1393/2007

Expresión diferencial del GASH/Sal tras estimulación sonora
- TRABAJO DE FIN DE MÁSTER -

Autora:

D.^a Sandra Marcela Díaz Rodríguez
Graduada en Biología

Tutores:

Dr. D. María Dolores López García
Dr. D. M. Javier Herrero Turrión

Salamanca, julio de 2018

Solicitud de Evaluación del Trabajo Fin de Máster
Curso Académico 2017/18

Dña. Sandra Marcela Díaz Rodríguez con NIE nº Y4944037V, domicilio en Calle Fray Junípero Serra 12 (Salamanca), teléfono 643151886, correo electrónico sandradiazrodriguez88@usal.es, alumna del Máster Universitario en Neurociencias de la Universidad de Salamanca,

EXPONE: Que ha finalizado el Trabajo Fin de Máster titulado “Expresión diferencial del GASH/Sal tras estimulación sonora” siendo tutores del mismo la Dra. M^a Dolores Estilita López García y el Dr. Manuel Javier Herrero Turrión

SOLICITA: ser admitido para su evaluación en la convocatoria del 18 de julio de 2018.

En Salamanca, a 10 de julio de 2018.

Fdo.: Sandra Marcela Díaz Rodríguez V.º B.º tutor: M^a Dolores E. López; M. Javier Herrero Turrión

**Sr. Presidente de la Comisión de Docencia del Máster Universitario en
Neurociencias**

Instituto de Neurociencias de Castilla y León

Universidad de Salamanca

RESUMEN

Introducción. La línea de hámster dorado o sirio (*Mesocricetus Auratus*) GASH/Sal es un modelo de epilepsia audiogénica de origen genético cuyo foco epileptógeno es el colículo inferior (CI). **Objetivos.** Analizar el transcriptoma del CI para obtener un perfil de expresión de los genes relevantes en la línea GASH/Sal que podría usarse para buscar un vínculo común con la epilepsia humana. **Metodología.** Utilizando la técnica de ARN-Seq en la plataforma Illumina 75bp Single-End, se han obtenido dos tipos de transcriptomas de los CIs de hámsteres controles y de la línea GASH/Sal, ambos sometidos a estimulación auditiva, alineándolos con dos genomas de referencia distintos, el del hámster chino (*Cricetulus griseus*) y el del propio hámster sirio. Posterior análisis comparativo de los dos transcriptomas con ambos genomas de referencia, nos permitió obtener un conjunto de genes diferencialmente expresados y, seguidamente, en base a los criterios de la diferencia del nivel de expresión (*Fold Change*, |FC| >1.5), p valor ($p < 0.05$) y *False Discovery Rate* (FDR), seleccionar un pequeño grupo de genes que fueron validados por PCR cuantitativa (qPCR). **Resultados.** Se determinaron 41 y 33 genes diferencialmente expresados empleando como referencia el genoma del hámster sirio y el del hámster chino, respectivamente, siendo el del primero de ellos, el que presentó un mejor alineamiento por base, cobertura, porcentaje de homología y mayor sensibilidad en la detección de los transcriptos. La comparativa entre ambos grupos de genes mostró que eran coincidentes 12 genes y 9 de ellos (*Atp2a3*, *C6*, *Egr1*, *Egr2*, *Egr3*, *Fos*, *Rxfp2*, *Slc28a1* y *Ttr*) se emplearon en la validación de las variaciones de expresión génica detectadas mediante la técnica de qPCR. **Conclusiones.** Los resultados muestran genes diferencialmente expresados en el CI de la línea de hámster sirio GASH/Sal que pueden servir como punto de partida para buscar los mecanismos epileptogénicos en este modelo animal y posibles correlaciones con la epilepsia humana.

Palabras clave: ARNseq, Epilepsia, expresión génica, GASH/Sal y qPCR.

ABSTRACT

Introduction. The golden or Syrian hamster line (*Mesocricetus auratus*) GASH / Sal is a model of genetically derived audiogenic epilepsy whose epileptogenic focus is the inferior colliculus (IC). **Objectives.** Analyze the IC transcriptome to obtain an expression profile of the relevant genes in the GASH / Sal line that could be used to look for a common link with human epilepsy. **Methodology.** Using the RNA-Seq technique on the Illumina 75bp Single-End platform, two types of transcriptomes were obtained from the control hamster ICs and those from the GASH / Sal line, both subjected to auditory stimulation, aligning them with two different reference genomes., that of the Chinese hamster (*Cricetulus griseus*) and that of the Syrian hamster itself. Subsequent comparative analysis of the two types of transcriptomes, with both reference genomes, allowed us to obtain a set of differentially expressed genes and, subsequently, based on the criteria of the difference in expression level (*Fold Change*, |FC| > 1.5), p value ($p < 0.05$) and *False Discovery Rate* (FDR), select a small group of genes that were validated by quantitative PCR (qPCR). **Results.** We determined 41 and 33 differentially expressed genes using the Syrian hamster genome and the Chinese hamster genome, respectively, being the first of them, which presented a better alignment by base, coverage, percentage of homology and greater sensitivity in the detection of transcripts. The comparison between both groups of genes showed that 12 genes were coincident and 9 of them (*Atp2a3*, *C6*, *Egr1*, *Egr2*, *Egr3*, *Fos*, *Rxfp2*, *Slc28a1* and *Ttr*) were used in the validation of the variations of gene expression detected by the qPCR technique. **Conclusion** The results show genes differentially expressed in the IC of the Syrian hamster line GASH / Sal that can serve as a starting point to look for the epileptogenic mechanisms in this animal model and possible correlations with human epilepsy.

Key words: Epilepsy, GASH / Salt, ARNseq, qPCR, transcript and gene expression

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNasa: ribonucleasa.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

ARN-Seq: ARN secuencia.

BLAST: herramienta básica de búsqueda de alineamiento local. Del Inglés Basic Local Alignment Search Tool.

CI: Colículo inferior.

CT: Ciclo umbral. Del inglés Del inglés cycle threshold.

DBA: Ratón castaño claro no agutí. Del inglés Dilute Brown Non-Agouti.

DNTPs: Desoxinucleótidos trifosfatos.

DT: Oligonucleótido.

Ensembl: Ensembl Genome Browser.

FC: Valor de cambio; nivel de expresión de un transcrito en una condición frente a otra. Del inglés fold change.

FDR: Descubrir falsa tasa.

GABA: Ácido γ -aminobutírico.

Gadph: Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa.

GAERS: Ratas Estrasburgo.

GASH/Sal: Genetic audiogenic seizure hámster: Salamanca.

GEPRs: Ratas genéticamente propensas a la epilepsia.

GPCR: Receptor de proteína G.

ILAE: Liga Internacional contra la Epilepsia.

MAC: Complejo de ataque de membrana.

NCBI: Centro nacional de biotecnología informático. Del inglés National Center for Biotechnology Information.

pAdj: Valor de p ajustado.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

RED: Gene edición de genomas rata.

RNasa: Ribonucleasa.

RT-qPCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa. Del inglés, reverse transcription polymerase chain reaction.

SEA: Servicio de experimentación Animal.

SwLo: Las ratas Swim Lo-Active.

β -act: β beta actina

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	4
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 Generalidades y modelos animales de epilepsia	7
1.2 Epilepsia audiógena: núcleos epileptógenos	7
1.3 El hámster sirio GASH/Sal como modelo experimental de epilepsia.....	8
1.4 Técnicas de análisis expresión génica	9
1.4.1 Análisis transcriptoma	9
1.4.2 PCR en tiempo real	10
1. JUSTIFICACION E HIPÓTESIS	11
2. OBJETIVOS	11
<u>OBJETIVO GENERAL:</u>	11
3. DISEÑO EXPERIMENTAL	12
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
5.1 Animales de Experimentación.....	12
5.2 Evaluación de los transcritos alineados con el genoma de hámster chino (<i>Cricetulus griseus</i>).	13
5.3 Alineación con las secuencias del genoma del hámster sirio (<i>Mesocricetus auratus</i>).....	13
5.4 PCR cuantitativas.....	14
5.4.1 Diseño de oligonucleótidos cebadores	14
5.4.2 Extracción de ARN	14
5.4.3 Cuantificación.....	15
5.4.4 Obtención de ADNc.....	15
5.4.5 Curva de dilución	15
5.4.6 PCR en tiempo real.....	15
5.4.7 Análisis de los datos de las qPCR.....	16
5. RESULTADOS.....	16
5.1 Actualización los resultados del transcriptoma del CI del GASH/Sal y el de su control, empleando como genoma de referencia el del hámster chino	16
5.2 Transcriptoma del CI de la línea de hámster sirio GASH/Sal y el de su control, empleando como genoma de referencia el del hámster dorado.....	17
5.3 Comparación los transcriptomas obtenidos con los dos tipos de genomas de referencia.	18

5.5 Validación por RT-qPCR de los genes diferencialmente expresados al comparar la línea GASH/Sal y su control.....	20
6. DISCUSIÓN	21
6.1 Discusión metodológica	21
6.2 Discusión de resultados.....	22
7. CONCLUSIONES	24
8. BIBLIOGRAFIA	24

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades y modelos animales de epilepsia

La epilepsia es una de las patologías más comunes del cerebro y afecta, aproximadamente, al uno por ciento de la población, con etiologías estructurales, genéticas, infecciosas, metabólicas, inmunes y desconocidas (WHO, 2006). La epilepsia de etiología genética afecta a un tercio de la población (Ottman, 2005), considerándose que aproximadamente seis síndromes de epilepsia humana pueden ser causados por herencia monogénica (Berkovic et al., 1997). Mucho de lo que hoy se conoce sobre la epilepsia se debe a la investigación con los modelos experimentales (Fisher et al., 2005); éstos modelos experimentales ensayados presentan epilepsia inducida mediante el uso de drogas convulsivantes, privación de metabolitos o estimulación eléctrica (Kandratavicius et al., 2014), y más recientemente, también se están utilizando modelos animales con predisposición genética a padecer este tipo de trastorno (Serikawa et al., 2015).

Los modelos animales de epilepsia con origen genético derivan de líneas endogámicas o cría selectiva, entre ellos se incluyen los siguientes modelos: ratas (*Rattus norvegicus*) Wistar Albino Glaxo con origen de cría selectiva susceptibles a crisis audiógenas (Doretto et al., 2003), el hámster GASH/Sal (Genetic audiogenic seizure hámster: Salamanca) con origen endogámico producidas por un patrón de herencia autosómica recesiva con susceptibilidad audiógena (Muñoz et al., 2016), ratas Estrasburgo con epilepsia genética de ausencia (GAERS) (Danober et al., 1998), ratas genéticamente propensas a la epilepsia (GEPRs) criadas selectivamente y con susceptibilidad audiógena y crisis tónico clónicas (Dailey et al., 1985) y, por último, ratas Swim Lo-Active (SwLo) con convulsiones corticales generalizadas obtenidas por cría selectiva (Tabb et al., 2007)

1.2 Epilepsia audiógena: núcleos epileptógenos

Los sonidos, al ingresar en el oído interno se convierten en una señal neural, ésta se transmite a través de núcleos auditivos de relevo antes de alcanzar a la corteza auditiva, los diferentes núcleos auditivos presentan una interconexiones con otras áreas cerebrales que transportan señales neuronales desde vías ascendentes, de uno o ambos oídos, que convergen desde los núcleos auditivos inferiores situados en el tronco del encéfalo hasta el colículo inferior (CI) (Morest, 1986; Kaltwaßer et al., 2013). El CI es un núcleo auditivo que tiene una gran relación con otros núcleos del sistema auditivo y la generación de ataques epilépticos en modelos de epilepsia audiógena (Kesner, 1966; Wada et al., 1970). Varios estudios experimentales han determinado que las neuronas del CI de la rata GEPRs muestran un aumento en las descargas similares a las que se observan en otros tipos de epilepsias y, tales descargas son específicas del CI pero no de la corteza (McCown et al., 1984). Asimismo, se ha observado que estas neuronas presentan un defecto en la inhibición mediada

por ácido γ -aminobutírico (GABA). Lo que pudiera causar una pérdida significativa de la inhibición en el conjunto neuronal del CI, originando la hiperexcitabilidad en este núcleo auditivo (Meldrum, 1975). Además, se ha comprobado que la estimulación eléctrica o química del CI también desencadena crisis epilépticas (McCown et al., 1984). En esta línea, estudios electrofisiológicos con ratones endogámicos DBA (susceptibles a padecer crisis audiogénicas) han mostrado anomalías en la respuesta neuronal del CI, en concreto, éstas están restringidas principalmente a la porción ventral su núcleo central (Martín, 2009). También, la microinyección de fármacos GABA miméticos o lesiones del CI, así como las lesiones del núcleo del septo interno, reducen la susceptibilidad a las convulsiones audiogénicas en ratas GEPRs (McCown et al., 1984). Asimismo, otros autores han inyectado aminoácidos, como glicina y taurina, en el CI, que actúan como neurotransmisores inhibitorios, observándose una inhibición de las crisis (Huxtable et al., 1978). En todos los modelos animales de epilepsia audiogénica, el desencadenamiento de las crisis epilépticas se debe a que, a través de las interconexiones del CI con el colículo superior, se genera una activación de núcleos motores y la sustancia gris periacueductal, que provoca el desencadenamiento de las fases tónico clónicas a través de la médula espinal (Faingold et al., 1994). La *International League Against Epilepsy* (ILAE) define las crisis epilépticas como un suceso patofisiológico y sustrato anatómico único (Fisher et al., 2005). Asimismo, nuestro grupo de investigación está trabajando en la búsqueda del sustrato molecular relacionado con la etiología epiléptica del CI (López et al., 2017), lo cual podría contribuir a desarrollar nuevas estrategias más eficaces para bloquear las crisis epilépticas y la consolidación de la línea GASH/Sal como un nuevo modelo de epilepsia que contribuya al avance en el estudio de esta enfermedad.

1.3 El hámster sirio GASH/Sal como modelo experimental de epilepsia

El hámster sirio GASH/Sal es una línea desarrollada en Salamanca, derivada de una línea de la Universidad de Valladolid. Presenta una epilepsia audiogénica de origen genético, con un patrón de herencia autosómica recesiva (Muñoz et al., 2016) y características similares a la epilepsia tipo Gran Mal que aparece en humanos). Las convulsiones en este hámster se originan por la estimulación auditiva con un sonido de alta intensidad. La susceptibilidad a padecer este tipo crisis patológica alcanza su grado máximo entre el segundo y cuarto mes de vida, para posteriormente desaparecer gradualmente (Muñoz et al., 2016). En este modelo se han caracterizado las crisis convulsivas como verdaderas crisis epilépticas (Carballosa, 2013), el patrón de su transmisión (Muñoz et al., 2016), las bases neuroquímicas y neuroanatómicas (Sánchez et al., 2016) y se ha evaluado su respuesta a fármacos antiepilépticos, (Barrera et al., 2016) lo que le acredita como un buen modelo de epilepsia audiogénica.

1.4 Técnicas de análisis expresión génica

1.4.1 Análisis transcriptoma

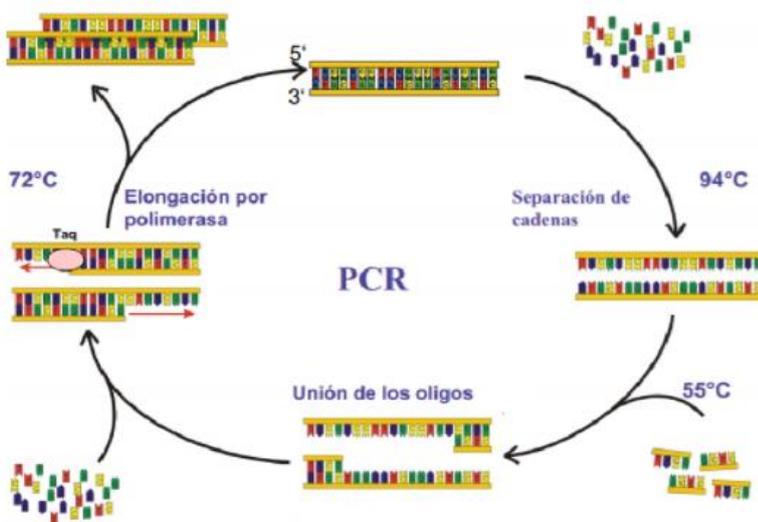
Un transcriptoma representa un porcentaje muy pequeño del genoma que se transcribe en moléculas de ARN (Adams, 2008) y está compuesto tanto de secuencias de ARN no codificantes como codificantes (Hiroi et al., 1998). Algunas de las técnicas contemporáneas de análisis de transcriptoma son los microarrays y ARN-Seq, que fueron desarrolladas a mediados de los años 1990 y 2000 (Wang et al., 2009). En los microarrays, se analizan los niveles de expresión génica de la totalidad de genes de una determinada especie a través de la hibridación de los ARNm (retrotranscritos a ADNc) a una matriz de sondas (Schena et al., 1995). Por su parte, las técnicas de ARN-Seq se basan en la retrotranscripción de ARNm a moléculas de ADNc, fragmentadas posteriormente en cadenas cortas y secuenciadas en plataformas como Illumina (Illumina, San Diego, California, EE. UU.), SOLiD (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.), Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) y PacBio (Pacbio, Menlo Park, CA, EE. UU.) (Wang et al., 2009). Finalmente, utilizando como referencia la secuencia conocida de un genoma de la misma especie o similar, mediante el análisis bioinformático, se reconstruye la secuencia completa de cada ARNm transcrito (Quail et al., 2012). El ARNseq se utiliza para identificar genes que se expresan en un determinado tejido o área tisular y en determinado momento (estadio, edad, etc.) (McGettigan, 2015). Esta técnica presenta una alta sensibilidad y precisión dependiendo del número de lecturas obtenidas de cada muestra. Las lecturas garantizan una cobertura óptima del transcriptoma, lo que permite la detección eficaz de la expresión de un determinado gen en una muestra (Tabla 1). Es importante resaltar que el genoma de referencia va a modelar y representar la secuencia de ADN del genoma de las especies de interés, por ello la selección de este genoma es clave, ya que permitirá una mejor lectura y cobertura de los genes (Rapaport et al., 2013).

PARÁMETRO	DESCRIPCIÓN	CÁLCULO
Cobertura	La profundidad de cobertura es el número de lecturas que alinean a la secuencia de referencia diana.	Histograma, cobertura media y cobertura por base
Alineamiento	Obtener anotación de los transcritos identificados.	Coberturas
Reproductibilidad	Ensayos con similitudes de resultados.	Comparación entre carreras
Sensibilidad, especificidad, tasa FN y FP	Sensibilidad: capacidad de detección de la muestra correctamente. Especificidad: capacidad de detección de las muestras incorrectas. FN: falso negativo FP: falso positivo.	Cálculo de la sensibilidad y la especificidad.

Tabla 1. Descripción de los parámetros de evaluación de un transcriptoma y la forma de su cálculo (Jennings et al., 2017)

1.4.2 PCR en tiempo real

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) es una PCR tradicional preparada para poder cuantificar los fragmentos de ADN amplificados (amplicones). La qPCR consiste esencialmente en un PCR convencional a la que le añade una sonda fluorescente que permitirá la cuantificación de los productos de PCR generados a lo largo de toda la PCR, ciclo a ciclo, mediante un análisis en tiempo real. Este sistema, por tanto, requiere de un termociclador al cual se le acopla un sistema de detección de fluorescencia (fluorímetro) (Klein, 2002).



Para la qPCR se utiliza un molde de ADN, un par de oligonucleótidos cebadores específicos, desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), un tampón de reacción adecuado, y una ADN polimerasa termoestable. A dicha mezcla, se le adiciona una sustancia marcada con un fluoróforo, para introducir posteriormente en el termociclador a tiempo real para poder cuantificar las muestras de

Figura 1. Esquema de las tres etapas que constituyen un ciclo de la PCR (Padro, 2010)

ADN amplificados con la repetición de un número de ciclos determinado (de 30 a 40 habitualmente), a su vez constituido cada uno de ellos, por tres mismas etapas en condiciones de temperatura diferentes sufriendo los siguientes pasos (Figura 1):

- Desnaturalización o separación de las cadenas de ADN a 94-95 °C
- Anillamiento o unión de los oligonucleótidos cebadores específicos del ADN molde a 50-65°C (dependiendo de la composición del oligonucleótido)
- Elongación o síntesis de la cadena complementaria al ADN molde por la acción de una ADN polimerasa a 68-72°C.

La qPCR utiliza la fase exponencial como área de detección de las muestras. Así, el parámetro fundamental de análisis en una qPCR es el ciclo umbral (*threshold cycle*, Ct), el cual se define como el ciclo al cual la fluorescencia es estadísticamente significativa por encima del fondo de ruido

(background), concretamente, cuando la fluorescencia supera 10 veces más la del fondo. De este modo, el Ct determina el ciclo inicial de amplificación en la fase exponencial y es inversamente proporcional al nº de copias inicial del molde. (Klein, 2002; Espy et al., 2006)

1. JUSTIFICACION E HIPÓTESIS

La caracterización de la línea de hámster sirio GASH/Sal permitirá validarlo como modelo experimental de epilepsia audiogénica. Para ello, se deben conocer exhaustivamente los cambios y alteraciones génicas que pueden ser la causa y la consecuencia del desencadenamiento de las crisis epilépticas en el núcleo epileptógeno. Con este trabajo, se pretende realizar un análisis más detallado del transcriptoma de la línea de hámster sirio GASH/Sal, que en un primer trabajo en nuestro grupo empleó como genoma de referencia el hámster chino (*Cricetulus griseus*) (López et al., 2017), especie con genoma secuenciado y evolutivamente más cercana al del hámster dorado, y establecer si se presentan diferencias y similitudes con una nueva alineación con el propio genoma del hámster sirio (*Mesocricetus auratus*), posteriormente publicado (Tchitchek et al., 2014). Nuestra hipótesis es que los genomas de referencias utilizados, hámsteres chinos y sirios, aportarán similitudes y diferencias en el transcriptoma del CI de la línea de hámster sirio GASH/Sal y, por supuesto, de su control (un grupo de hámsteres sirios sin patología audiogénica), tanto en porcentajes de homología, número de transcritos secuenciados y en el alineamiento entre secuencias, demostrando cuál es el genoma de referencia más eficiente y sensible posterior comparativa de la expresión génica diferencial del CI de la mencionada línea de hámster y su control bajo el mismo estímulo sonoro.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Obtener los genes diferencialmente expresados en el núcleo desencadenante de las crisis epilépticas, el CI, de la línea de hámster sirio GASH/Sal en comparación al de su control.

Objetivo 1: Actualizar los resultados del transcriptoma del CI de la línea de hámster sirio GASH/Sal y el de su control, empleando como genoma de referencia el del hámster chino (*Cricetulus griseus*).

Objetivo 2: Obtener el transcriptoma del CI, núcleo epileptógeno de la línea de hámster sirio GASH/Sal y el de su control, empleando como genoma de referencia el propio de su especie.

Objetivo 3: Comparar los resultados obtenidos, transcriptomas del CI de la línea de hámster sirio GASH/Sal y de la de su control, con dos genomas de referencia distintos, el del hámster chino y el del propio hámster sirio.

Objetivo 4: Validar los resultados de variaciones de expresión génica al comparar los dos tipos de transcriptomas del CI (control vs. GASH/Sal) por la técnica de qPCR.

3. DISEÑO EXPERIMENTAL

- En la actualización de los transcriptomas del CI de hámsteres sirios control y GASH/Sal alineado con el genoma de referencia de *Cricetulus griseus*, se realizará un ajuste de la significación estadística y la identificación de los transcritos no identificados en 2014 (Objetivo 1)
- Para obtener el transcriptoma del CI del núcleo epileptógeno de la línea de hámster sirio GASH/Sal se utilizará el genoma de referencia MesAur1.0 (hámster sirio) (GCA_000349665.1) (Tchitchek et al., 2014) (Objetivo 2).
- Para establecer las diferencias y semejanzas del transcriptoma GASH/Sal estimulado vs. el control estimulado empleando los dos genomas de referencias (hámster chino y sirio), se evaluarán los ficheros Excel (controlvsgash_DE.xlsx (*Mesocricetus*) y Differential_expression-IDs (*Cricetulus*)) y se seleccionará el valor de expresión diferencial (Fold Change- FC), significación estadística (valor de p) y la cobertura del transcrito para su validación (Objetivo 3).
- Usando la técnica qPCR, se validarán las expresiones de algunos de los genes diferencialmente expresados en el CI al comparar ambos transcriptomas (objetivo 4).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Animales de Experimentación.

En este estudio, se emplearon animales 6 hámsteres sirio controles y 6 hámster sirio GASH/sal de sexo masculino con tres meses de vida y un peso aproximado de 90 a 120gr, obtenidos en el Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Salamanca, alojados en cajas de policarbonato en habitaciones con la temperatura y humedad controladas, ciclos de 12 horas de luz y oscuridad. Todos los animales fueron expuestos a una estimulación auditiva dentro de un cilindro de acrílico, con una estimulación acústica semialeatoria de 0 a 18 kHz con una intensidad de 115 a 120 dB (Carballosa et al., 2013). Sesenta minutos después de las convulsiones epilépticas, los hámsteres fueron anestesiados bajo anestesia inhalatoria con isoflurano al 4%, 1L/min O₂ para la sedación (Forane, Abbot Laboratories, Estados Unidos), inhalatoria con isoflurano al 4%, 1L/min O₂ para la sedación (Forane, Abbot Laboratories, Estados Unidos), decapitados y sus cerebros fue extraídos, embebidos en tubos con TRIzol® (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, EE.UU.) Trizol® y almacenados hasta su uso a 70°C. Todos los experimentos con animales fueron realizados cumpliendo la normativa española vigente (RD 53/2013, BOE 34/11370-421, 2013), en la que se establecen las normas básicas

aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, y tras la aprobación por parte del Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca.

5.2 Evaluación de los transcritos alineados con el genoma de hámster chino (*Cricetulus griseus*).

Se volvió a analizar la expresión diferencial del CI del GASH/Sal, obtenida del análisis informático de los transcritos del CI alineados con el genoma de *Cricetulus griseus*, teniendo en cuenta la información actualizada a 2017 del genoma de referencia en Ensembl. En este análisis se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros:

- **FoldChange (FC):** Es el nivel de expresión de un transcrito en una de una determinada condición frente a otra. En este trabajo se ha tomado la consideración de los genes diferencialmente expresados por encima de 1,5 (sobre-expresado) o por debajo -1,5 (infra-expresado) [$|FC| > 1.5$].
- **p valor:** Es valor estadístico que se define como la probabilidad correspondiente al estadístico de ser posible bajo la hipótesis nula, si cumple con la condición de ser menor al nivel de significancia impuesto arbitrariamente, entonces la hipótesis nula será, eventualmente, rechazada. Valor de $p \leq 0,05$ se realiza en base al valor de FC.
- **Valor de p ajustado (pAdj):** Determina una categoría funcional como estadísticamente sobre-representada mediante *False Discovery Rate* (FDR).
- **Longitud del alineamiento:** Obtenido mediante el programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), herramienta que permite la comparación y búsqueda de secuencias.
- **Porcentaje Homología:** Porcentaje de homología entre secuencias
- **Identificación de Transcritos:** Buscando referencias de la secuencia en la plataforma web *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), *Gene Editing Rat Resource Renter* (RED), *Ensembl Genome Browser* (Ensembl) y *universal protein* (UniProt).

5.3 Alineación con las secuencias del genoma del hámster sirio (*Mesocricetus auratus*)

Los datos de lecturas obtenidas con la técnica de ARN-Seq, obtenidas del CI de hámsteres GASH/Sal y controles estimulados sonoramente, fueron utilizados en un nuevo análisis bioinformático, realizado por el servicio de bioinformática de la universidad de Salamanca, utilizando la plataforma Illumina 75bp Single-End, alineándolo con el genoma de referencia MesAur1.0 (GCA_000349665.1) (Tchitchek et al., 2014). Para este análisis, se utilizó como valor estadístico un $p \leq 0,05$ y se evaluó: la calidad de las lecturas, la distribución de los valores de expresión, FC, alineamiento y la identificación de los transcritos. En cuanto a la comparativa del análisis de los transcritos con los diferentes genomas de referencia, se utilizaron los mismos parámetros indicados en el anterior apartado.

5.4 PCR cuantitativas

5.4.1 Diseño de oligonucleótidos cebadores

Se seleccionaron un total de 9 genes para validar mediante RT-qPCR las variaciones de expresión génicas obtenidas al comparar los transcriptomas del CI. Las secuencias de estos genes fueron obtenidas del banco de datos *Ensembl Genome Browser* (<https://www.ensembl.org/index.html>). Los oligonucleótidos cebadores fueron diseñados interexónicos para evitar la expresión de posibles restos de DNA genómico, utilizando el software Primer3v.0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) y teniendo en cuenta los siguientes parámetros: amplicón de 70 a 200 bases, tamaño de los oligonucleótidos de 20 a 25 bases y temperatura de fusión en torno a 60 °C. Asimismo, en la evaluación de la validez de los cebadores, se utilizó la plataforma web NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/>), mientras que su especificidad se evaluó en la página web PrimerBLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) (tabla 2).

CEBADORES		
G3hrb8	Foward	GACGACAAGAACAACATCAAGG
	Reverse	ACAGAGGCAAGGAATTTGTCC
Slc28a1	Foward	TTAATTGCTGCCTCCGTAATG
	Reverse	GAACTTGGACTCCTCCACCTC
Rxfp2	Foward	AAGCTGTGCCAAAGGTTTCTA
	Reverse	TTGCTGAAAACCTTGACTGGAA
C6	Foward	CTGTGTCCTTGGAGACTACGG
	Reverse	GTCACCAGAGGTTCTGTGCAT
Egr4	Foward	ACCGCCTCGGCTATATAAGTG
	Reverse	AGACAGGAAGGGTAACGGGTA
Slc2a5	Foward	GCTTCGTCTCAGTGTGGAAGT
	Reverse	CCCCAAAACCTACCACGAAT
Pkm	Foward	CTGTCAGGAGAAACAGCCAAG
	Reverse	TTCCTCGAATAACTGCAAGTG
Ttr	Foward	GCCTCGCTGGACTG(G/A)(C/T)ATTT(A/G)
	Reverse	TCGGACAGCATCCAGGACTT
Fos	Foward	CAGCTCGCACCAGTGTCTAC
	Reverse	ACTTCCGGAAAACATCATGG
Gapdh	Foward	ACATGCCGCTGGAGAAACCT
	Reverse	GCCCAGGATGCCCTTTAGTGG
β-actin	Foward	AGCCATGTACGTAGCCATCC
	Reverse	ACCCTCATAGATGGGCACAG

Tabla 2. Oligonucleótidos cebadores para *Mesocricetus auratus* y *Cricetulus griseus* empleados en la qPCR.

5.4.2 Extracción de ARN

Para la extracción de ARN, se empleó una modificación de método de Chomczynski et al; 1987, Se utilizó 1 ml de TRIzol® por cada 100 mg de tejido, y se procedió a la homogeneización del mismo. Tras incubar 5 minutos a temperatura ambiente, se realizó una extracción selectiva del ARN por separación de fases mediante la adición de 200 μ l de cloroformo por cada mililitro de TRIzol® (Gibco

BRL, Gaithersburg, MD, EE.UU.) inicial, centrifugando a 12.000 g durante 15 minutos a 4 °C. El ARN se precipitó con isopropanol centrifugado a 12.000 g durante 10 minutos a 4 °C. Tras retirar el precipitado y se lavó con etanol 70%, centrifugando a 7.000 g durante 5 minutos a 4 °C. Finalmente, se eliminó el sobrenadante y secando a temperatura ambiente. Por último, se resuspendió en agua ultrapura libre de ribonucleasa, incubando a 60 °C durante 10 minutos, para favorecer la disolución del precipitado.

5.4.3 Cuantificación

La concentración del ARN se determinó por espectrofotometría con un equipo NanoDrop (NanoDrop 2000C espectrofotómetro, Thermo Scientific) (Scientific, 2009)

5.4.4 Obtención de ADNc

Se utilizó el *kit ImProm-II™ Reverse Transcripción System* (Promega, 2001), con una concentración final de (10 ng/μl) ARN. Seguidamente, se realizó una mezcla de (1-1,8 μg) de ARN total (depende de la muestra), 1 μg del oligonucleótido (dT) y se incubó a 70 °C durante 5 minutos. Para la síntesis de ADNc, se realizó una incubación en una mezcla de: tampón 5 X *ImProm-II™* (4 μl), MgCl₂ (4,5 μl), dNTP (desoxinucleótidos tri-fosfato) (1 μl), RNasa (Ribonucleasa) (0.5 μl) y transcriptasa inversa *ImProm-II™* (1 μl). Se incubó a 25C[®] (5 min), 42 C[®] (60 min), 70 C[®] (15 min) y 4C[®] (60 min ó ∞), obteniendo un volumen final de ADNc de 15 μl.

5.4.5 Curva de dilución

Para determinar la concentración óptima de muestra necesaria para el ensayo de PCR, se realizó una curva de dilución de ADNc (Livak et al., 2001). Empleando diluciones seriadas de ADNc de: 40, 20, 10, 5, 2,5 y 1,25 ng de ADNc.

5.4.6 PCR en tiempo real

El volumen final para cada reacción de qPCR fue de 15 μl: se utilizaron 7 μl de PCR Master Mix Power (SYBR-Green Applied Biosystems), 0,8 μl de cada cebador, 6,2 μl de agua libre de nucleasa-ribonucleasa y 2 μl de ADNc (a una concentración de 10 ng/μl). La amplificación de PCR se realizó en el termociclador (ABI Prism 7000, Applied Biosystems), según el siguiente perfil térmico: 10 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 15 s a 95 °C y 1 minuto a 60 °C (Biosystems, 2008). Como control endógeno, se analizaron los perfiles de expresión de dos genes, βactina (β-act) y gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (Gadph) implementados en la normalización.

5.4.7 Análisis de los datos de las qPCR

Para evaluar los cambios en los niveles de expresión de los genes diferencialmente expresados, se evalúan los valores logarítmicos de fluorescencia frente al número de ciclos, lo que permite valorar la cantidad de ADNc inicial. Estos valores, son inversamente proporcionales a la cantidad de ADNc inicial y se expresan como Ct (del inglés, cycle threshold) o ciclo umbral (Schmittgen et al., 2008). El tipo de análisis de datos empleado para la cuantificación de las qPCRs fue el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$, que permite el análisis del cambio relativo en la expresión de genes, a partir de los valores del Ct obtenidos en las qPCRs. Los resultados de los parámetros estudiados en las diferentes condiciones experimentales se compararon entre los diferentes grupos haciendo uso del test t de Student para variables independientes. Los resultados se consideraron significativos cuando $p \leq 0,05^*$ y $p \leq 0,001^{***}$

5. RESULTADOS

5.1 Actualización los resultados del transcriptoma del CI del GASH/Sal y el de su control, empleando como genoma de referencia el del hámster chino

En 2016, nuestro laboratorio reportó 82.034 transcritos en el CI de la línea de hámster sirio GASH/Sal estimulado y 83.580 en el hámster control estimulado. Todos estos genes identificados fueron filtrados con un umbral de $|FC| \geq (\pm) 2,0$ y $p \leq 0,05$, obteniendo un total de 58 genes diferencialmente expresados (cinco se correspondían con genes desconocidos), 33 de ellos se encontraban sobre-expresados y 25 infra-expresados (López-López et al., 2016).

IDENTIFICACIÓN	FOLDCHANGE	PVAL	PADJ	%HOMOLOGY	GENE
NW_003615248.1	45,0	4,0296E-06	0,00359654	100	<i>G3HBR8</i>
NW_003614949.1	8,2	2,1419E-11	4,8855E-08	99,9	<i>Tuba1c</i>
NW_003614964.1	1,9	3,7818E-11	7,0575E-08	94,43	<i>LOC100757738</i>
NW_003616187.1	-1,7	1,0062E-07	0,0001215	95,14	<i>(Rn28s1 45S ribosomal ARN)</i> <i>(loc107977290ncARN)</i>
NW_003614084.1	-142,0	1,5156E-18	6,2223E-15	100	<i>Rxfp2</i>

Tabla 3. Genes diferencialmente expresados en la comparativa de los transcriptomas del CI de la línea de hámster GASH/Sal frente al de su control identificados con la actualización del genoma de referencia del hámster chino, *Cricetulus griseus*.

Seguidamente, teniendo en cuenta otros dos parámetros estadísticos ($pAdj \leq 0.05$ y el FDR) que validaran con mayor seguridad los resultados obtenidos, el número de genes diferencialmente expresados se redujo a un total de **33 genes**, de los cuales 24 se encontraban sobre-expresados y 9 infra-expresados. Tras la actualización genoma de referencia *Cricetulus griseus* en julio del 2017, se identificaron los cinco genes desconocidos, que se corresponden con: *Rxfp2* (péptido 2 de la familia de relaxina), *G3hbr8* (subunidad de hemoglobina alfa), *Tuba1c* (tubulina, alfa 1C), *LOC100757738* (pseudogén de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), *Rn28s1 45S ribosomal ARN*,

loc107977290ncARN, determinándose la totalidad de los genes diferencialmente expresados tomando como referencia genómica la del hámster chino (Figura 2 y tabla 3).

5.2 Transcriptoma del CI de la línea de hámster sirio GASH/Sal y el de su control, empleando como genoma de referencia el del hámster dorado

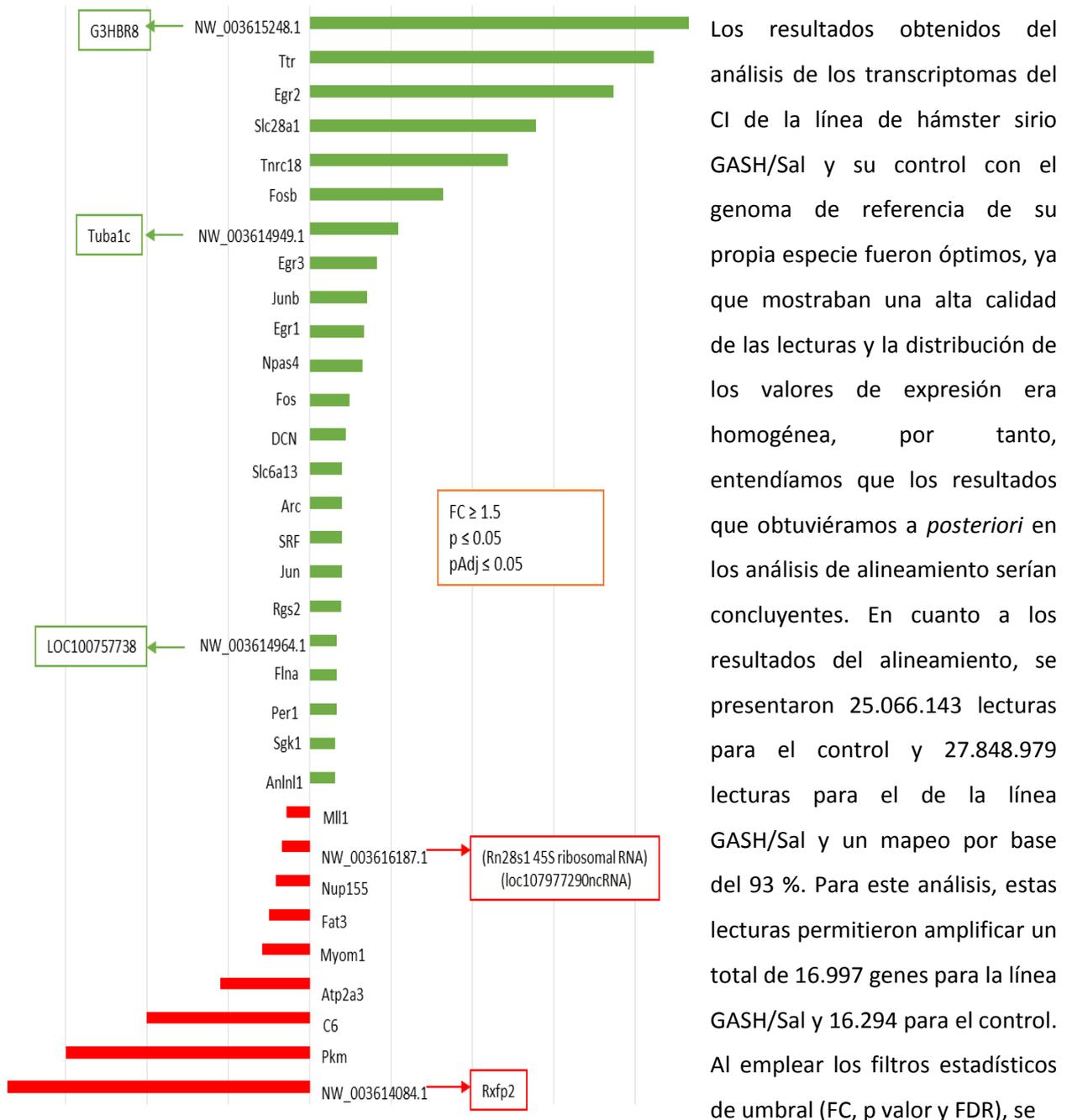
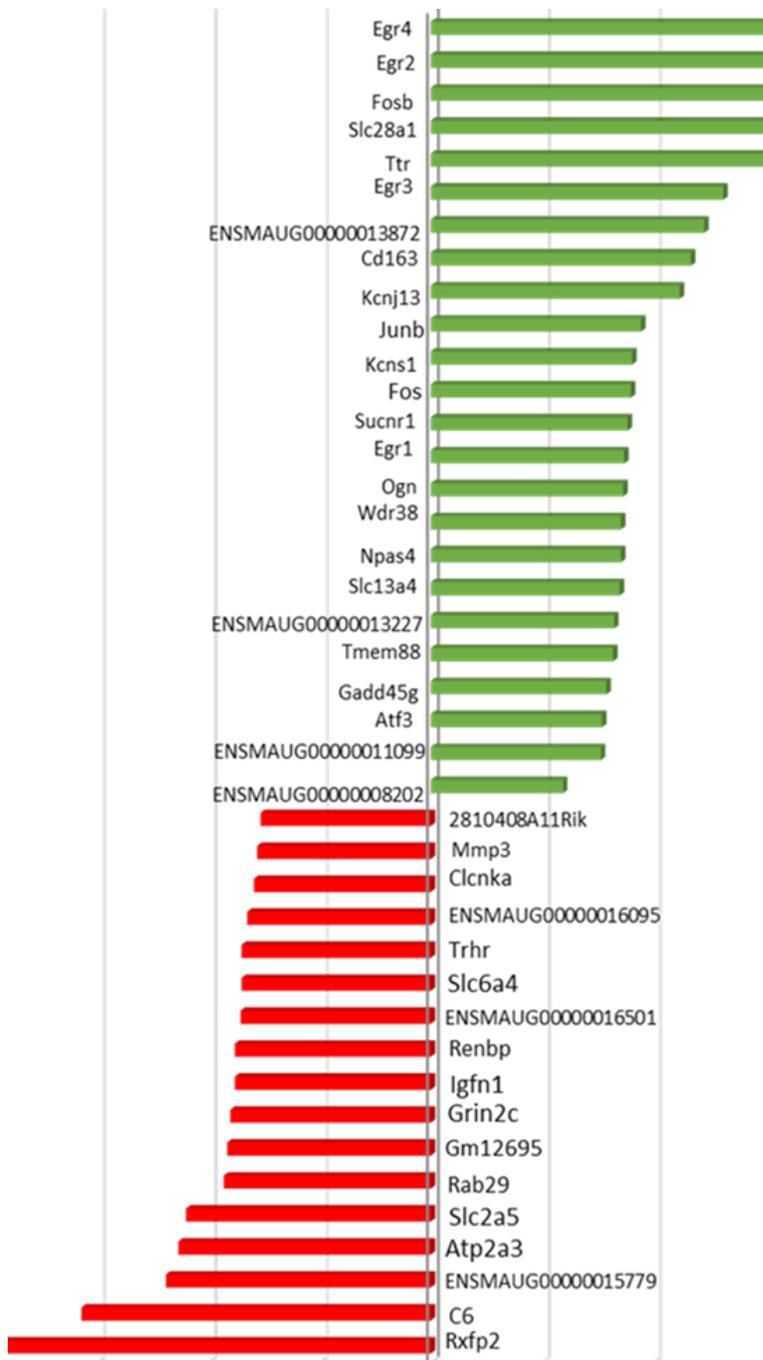


Figura 2. Descripción e identificación de los genes diferencialmente expresados en el CI al comparar los transcriptomas de la línea GASH/Sal frente a la de su control, usando el genoma de *Cricetulus griseus* como referencia. En verde, genes sobre-expresados y en rojo los infra-expresados

podieron observar **41** genes diferencialmente expresados entre ambos grupos de animales, 17 de los cuales eran genes infra-expresados y 24 genes supra-expresados (Figura 3 y Tabla 4). Estos genes presentan relación con el transporte de iones, algunos receptores de membrana, apertura de canales, oncogenes, metalopeptidasas, factores de transcripción y factores de crecimiento. Es importante destacar que **7** de los genes diferencialmente expresados presentaron secuencias



incompletas, no obstante, se pudieron obtener homologías con otros genes conocidos. Finalmente, en la búsqueda de asociaciones patológicas de los genes diferencialmente expresados, se pudo determinar la relación del gen *Fosb* con la epilepsia (Yutsudo, 2013) y los genes *Fos* y *Grin2c* con convulsiones espontáneas (Gautier et al., 2015 y Kearney, 2017)

5.3 Comparación los transcriptomas obtenidos con los dos tipos de genomas de referencia.

Al analizar los resultados los transcriptomas obtenidos con los alineamientos con los dos tipos de genomas de referencia, *Mesocricetus auratus* y *Cricetulus griseus*, se observaron diferencias fundamentalmente metodológicas.

Figura 3. Descripción e identificación de los genes diferencialmente expresados en el CI al comparar los transcriptomas de la línea GASH/Sal frente a la de su control, usando el genoma de *Mesocricetus auratus* como referencia. En verde, genes sobre-expresados y en rojo los infra-expresados

El promedio de lectura por base con respecto a su diana fue del 53% y del 93% tomando como referencia el genoma *Cricetulus griseus* y *Mesocricetus auratus* respectivamente. Por otro lado, en relación a los genes diferencialmente expresados obtenidos al comparar los dos transcriptomas del CI (Control vs. GASH/Sal) empleando los dos tipos de genomas de referencia, se observó una mayor cobertura en la referencia del genoma del hámster sirio. Con respecto al número de genes amplificados presentó una mayor cantidad el análisis del hámster chino, pero con mayor cobertura con la referencia del hámster sirio. Adicionalmente, al evaluar los genes diferencialmente expresados en los dos tipos de análisis que utilizaron distintos genomas de referencia, se determinaron 11 genes idénticos (*Atp2a3*, *C6*, *Egr1*, *Egr2*, *Egr3*, *Fos*, *Fosb*, *Junb*, *Npas4*, *Rxfp2*, *Slc28a1* y *Ttr*) presentando una reproductibilidad del alineamiento con los dos genomas de referencias en la detección de transcritos de aproximadamente un 40%.

GENE	FOLDCHANGES	DESCRIPCION	
Rxfp2	-5,69	Relaxina/ insulina familia de receptor 2	
C6	-3,14	Complemento componente 6	
Atp2a3	-2,27	ATPase, Ca++ transporte, ubiquitina	
Slc2a5	-2,2	Familia de portadores de soluto 2	
Rab29	-1,86	RAB29, miembro RAS familia oncogenes	
Gm12695	-1,83	Predicción de gen 12695	
Grin2c	-1,8	Glutamato receptor, inotrópico, NMDA2C	
Igfn1	-1,76	Dominio tipo inmunoglobulina y fibronectina tipo III	
Renbp	-1,76	Proteína de unión a renina	
Slc6a4	-1,7	Transporte de neurotransmisor serotonina	
Trhr	-1,7	Receptor de la hormona liberadora de tirotropina	
Clcnka	-1,59	Canal de cloruro, Ka sensible a la tensión	
Mmp3	-1,56	Matriz metalopeptidasa	
2810408A11Rik	-1,53	RIKEN ADNc 2810408A11 gene	
Atf3	1,58	Factor transcripción 3	
Gadd45g	1,64	Detención de crecimiento y gamma 45 inducible por daño en ADN	
Tmem88	1,65	Proteína transmembrana 88	
Slc13a4	1,71	Soluto carrier familia 13	
Npas4	1,71	Proteína neuronal de dominio PAS 4	
Wdr38	1,73	WD repetido dominio 38	
Ogn	1,74	Osteoglicina	
Egr1	1,77	Respuesta de crecimiento temprano 1	
Sucnr1	1,8	Receptor de succinato 1	
Fos	1,81	FBJ osteosarcoma oncogene	
Kcns1	1,89	Canal bloqueado por voltaje K +, subfamilia S, 1	
Junb	1,19	Jun B proto-oncogene	
Kcnj13	2,24	Canal de rectificación interna del potasio, subfamilia J, miembro 13	
Cd163	2,34	CD163 antígeno	
Egr3	2,63	Respuesta de crecimiento temprano 3	
Ttr	3,3	Transtiretina	
Fosb	3,34	FBJ osteosarcoma oncogene B	
Slc28a1	3,85	Familia de portadores de soluto 28 (
Egr2	3,9	Respuesta de crecimiento temprano 2	
Egr4	3,92	Respuesta de crecimiento temprano 4	
TRANSCRIPTOS SIN DESCRIBIR	FOLCHANGES	EXONES Y SECUENCIA	ORTOLOGO
ENSMAUG00000015779	-2,38	5 completo	wnka4 (Proteína quinasa 4 deficiente en lisina)

ENSM AUG00000010962	-1,76	30 incompleta	<i>DST</i> distonina,
ENSM AUG00000016095	-1,65	1 completa	-
ENSM AUG00000008202	1,53	7 incompleta	4930562C15Rik
ENSM AUG00000011099	1,54	6 incompleta	-
ENSM AUG00000013227	1,70	8 incompleta	-

Tabla 4. Descripción de los genes diferencialmente expresados en la comparativa de los transcriptomas del CI de la línea de hámster GASH/Sal frente al de su control empleando el genoma de *Mesocricetus auratus*

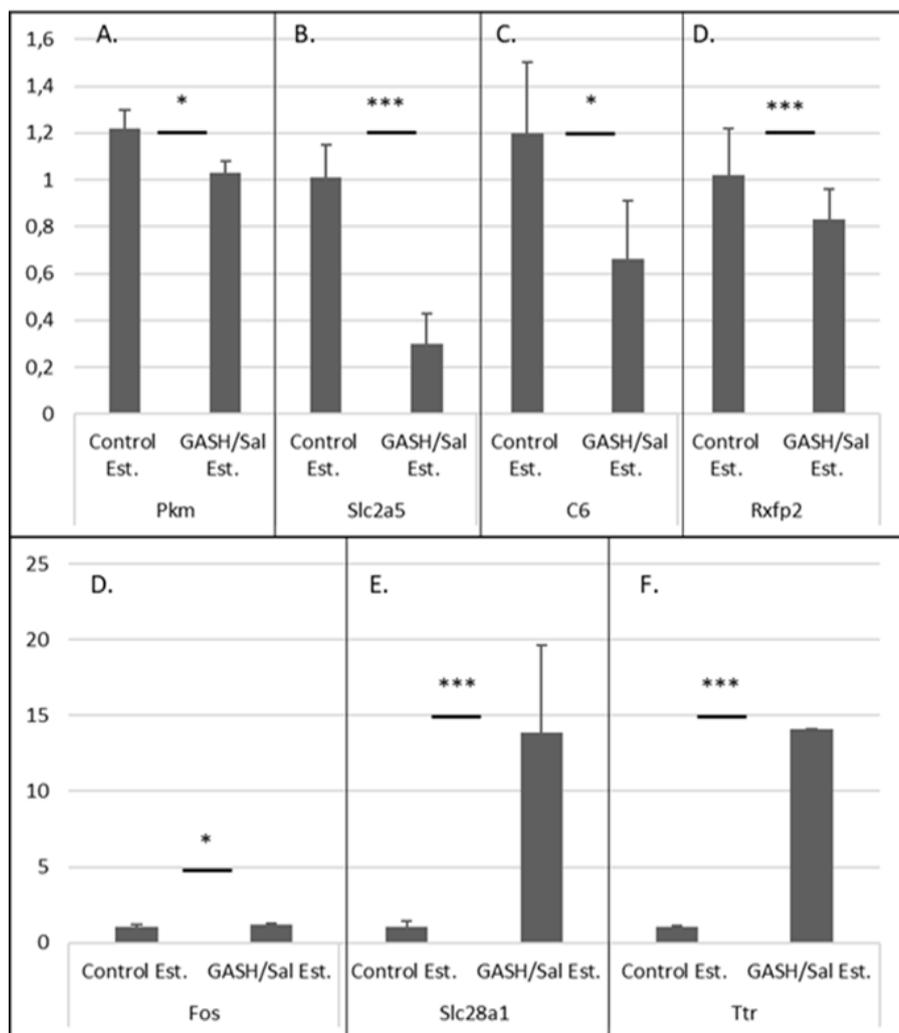


Figura 5. Número de animales 6, Análisis por RT-qPCR de los genes Diferencialmente expresados al comparar la línea de hámsteres sirios GASH/Sal y su control al que se aplicó el mismo estimulado sonoro (est.).

Significancia estadística: $p < 0,05$ (*), $p < 0,001$ (***)

Las barras de error indican la desviación del estándar (SD)

Para ello, fueron seleccionados 12 genes: *G3hbr8* y *Pkm* (propios de la comparativa empleando como genoma de referencia el del hámster chino), *Slc2a5* y *Egr4* (propios de la comparativa empleando como genoma de referencia el del hámster sirio) y 8 genes diferencialmente expresados en el análisis comparativo empleando ambos genomas de referencia (*C6*, *Fos*, *Rxfp2*, *Slc28a1*, *Egr1*, *Egr2*, *Egr3*, y *Ttr*). En el caso de los genes *Egr1*, *Egr2* y *Egr3*, nuestro grupo de investigación previamente había

5.5 Validación por RT-qPCR de los genes diferencialmente expresados al comparar la línea GASH/Sal y su control

Mediante la técnica RT-qPCR, hemos validado los resultados obtenidos de variaciones de expresión génica al comparar los transcriptomas (control vs. GASH/Sal) empleando los genomas del hámster chino y sirio, con la finalidad de determinar el genoma de referencia más óptimo para ser utilizado en posteriores estudios.

confirmado por RT-qPCR la sobreexpresión de tales factores de transcripción observada al comparar los transcriptomas del CI de la línea de hámsteres sirios GASH/Sal y su control, ambos tras el mismo estímulo sonoro. Por tanto, con este estudio se demuestra que estos tres factores de transcripción están verdaderamente implicados en la crisis epileptógenas (López-López et al., 2017). En cuanto al estudio de la expresión génica de *G3hbr8* y *Egr4*, éstos no obtuvieron ningún tipo de resultado, ya que aun cuando se diseñaron distintos tipos de oligonucleótidos cebadores, ninguno de ellos logró amplificar un amplicón específico. La verosimilitud de la secuencia genómica correspondiente a ambos genes quizás deba verificarse. Por su parte, en el caso de los genes *Pkm* y *Slc2a5*, el análisis de su expresión génica por RT-qPCR confirmó el resultado obtenido al comparar los transcriptomas GASH/Sal vs. Control. En concreto, se observó un descenso de su expresión, significativo estadísticamente, en la línea de hámster GASH/Sal estimulado en comparación a la del hámster control (Figura 5 A,B) Por último, en la validación de los genes restantes, comunes en la comparativa de los transcriptomas empleando los dos genomas de referencia, pudimos confirmar los resultados obtenidos. Así, tanto el gen *C6* como el *Rxfp2* se mostraron infra-expresados significativamente, mientras que los genes *Fos*, *Slc28a1*, y *Ttr* fueron reportados como sobre-expresados significativamente (Figura 5 C, D, E, F).

6. DISCUSIÓN

Los modelos animales con origen genético son una importante herramienta para determinar los factores y genéticos que inducen la epilepsia. Conocer dichos factores, nos permitiría relacionarlos con la epilepsia humana y validar un modelo de epilepsia de tipo genético.

6.1 Discusión metodológica

En el presente estudio, se utilizó la técnica de ARNseq con las referencias del genoma de hámster chino y dorado, para determinar los cambios en la expresión génica en GASH/Sal y hámster control después de un evento convulsivo; Según Martín y Wang 2013, el ARNseq con la estrategia de alineamiento por referencia genómica, permite una mayor sensibilidad y especificidad en la construcción del transcriptoma, pero depende de la versión del genoma y su actualización para obtener una cobertura que permita una alta resolución del análisis, en este estudio se observó un alineamiento superior con la referencia del genoma de hámster dorado permitiendo un mayor confiabilidad con este análisis. Con respecto al cobertura por base era mayor en referencia del hámster dorado, según Wong y colaboradores 2015, una cobertura por base del 98% -100% permite una detección específica de cada una de las bases del transcripto, generando un análisis óptimo del transcriptoma; esto quiero decir que la referencia de hámster dorado es la más fiable con respecto a la cobertura por base.

Mediante ARNseq, podemos obtener una gran cantidad de información de transcripción, así como perfiles de expresión de miles de genes, que necesariamente no presenten una detección y un alineamiento óptimo; cabe mencionar, que los filtros implementados en el análisis informativo aumentará o disminuirá la cantidad de genes descritos, con filtros menos estrictos se producirá, una mayor número de falsos positivos (Zhong et al., 2009). Según lo encontrado en este estudio el hámster dorado presenta menor cantidad de genes expresados, pero con mejores cobertura y alineamiento.

En la comparación de los perfiles de expresión génica se observaron 11 genes similares entre los genomas de referencia, Kanwal y colaboradores 2017, menciona que la reproductibilidad es muy variante por la cantidad de programas computacionales particulares, técnicas y equipos que existen en cada laboratorio y por esto la reproducibilidad de los resultados entre institutos es fluctuante, recomendado para realizar una validación de un diseño, rehacer el experimento en el mismo entorno para obtener el mismo resultado y validar por medio de otras técnicas los resultados con características más relevantes en el estudio (Vitek et al., 2011). Por consiguiente, confirmar los genes expresados con las referencias de los genomas es muy importante para la fiabilidad del resultado del transcriptoma del hámster dorado GASH/Sal después de un evento de convulsión.

6.2 Discusión de resultados

Según Xiao et al., 2014, es de suma importancia el diseño del cebador en la detección de la diana mediante RT-qPCR y la posterior validación del transcriptoma. Estos dos resultados deben poseer correlación significativa para ser fiables y validar los genes de interés; En este estudio, para validar los resultados de ARNseq, comparamos el resultado con los datos de RT-qPCR cuyas muestras se encuentran en la misma condición del ARNseq, evaluamos los genes de expresión diferencial *C6*, *Fos*, *Rxfp2*, *Slc28a1*, *Ttr*, *Pkm*, *Slc2a5*, *G3hbr8* y *Egr4*.

Con respecto a los genes que se encontraron en las dos referencias, el componente del complemento *C6* es una proteína modular que participa en el ensamblaje del complejo de ataque de membrana (MAC). La formación de MAC genera canales transmembrana, que puede destruir células susceptibles o transmitir señales de apoptosis (Müller, 1986). Buckingham et al., 2014, mostraron que la deficiencia de MAC por inhibición reduce significativamente el número de descargas epileptiformes y convulsiones, probable la infra-expresión de *C6* encontrada en el CI del hámster sirio GASH/Sal posea relación con la inhibición del MAC y actuó como un modulador después de la convulsión y por ello se encuentre infra-expresado en este modelo animal. La familia de genes *Fos*

son factores de transcripción reguladores de la proliferación celular, diferenciación, transformación y muerte celular (Applegate et al., 1995). En estudio posteriores, se ha observado por medio de inmunohistoquímica una sobre-expresión de *Fos* en varias zonas del cerebro después de un evento de convulsión tónico-clónica (Samoriski et al., 1998), similar a lo encontrado en este estudio, pero a nivel molecular. La *Ttr* es una proteína que transporta vitamina A y la hormona tiroxina; se produce en el sistema nervioso central y puede causar afectaciones neurológicas que incluyen epilepsia (Storjord et al., 2015). Esta relación con la epilepsia ha sido demostrada por Claassen et al., 2017, con aumento del biomarcadores *Ttr* a nivel celular en pacientes con convulsiones, similar a lo encontrado en este trabajo pero a nivel molecular (Claassen et al., 2014). El gen *Rxfp2* codifica un miembro de la familia de GPCR (receptor de proteína G), que desempeña diversos papeles dentro del sistema reproductivo femenino y masculino; también, se ha observado que la delección de este gen genera criptorquidia (Bathgate et al., 2006). En cuanto al gen *Slc28a1*, codifica un transportador de nucleósidos que recupera pirimidinas de la orina en el riñón, pero también puede tener un papel en la activación inmunitaria (Mychalekyj et al., 2017) y se encuentra relacionado con cáncer (Cheuk et al., 2015). No se ha encontrado una relación con epilepsia o convulsiones y estos dos últimos genes.

Si analizamos los genes que se encontraba referenciados con uno u otro genoma se pudo determinar que el gen *Pkm* (hámster chino) codifica una proteína involucrada en la glucólisis, presente en tejidos en los que se deben proporcionar rápidamente grandes cantidades de energía y altas tasas de síntesis de ácidos nucleicos, y se encuentra involucrada en la patogénesis bacteriana (Mazureka et al., 2005); no se ha encontrado un relación directa con la epilepsia o las convulsiones, pero en un artículo de Marques et al., 2017, en un análisis de proteómica del hipocampo de ratas sometidas al modelo de la epilepsia de Li-pilocarpina, se observó una disminución en la expresión de *Pkm*, similar a lo observado en nuestro estudio. En relación al gen *G3hbr8*, que no amplificó por RT-qPCR, no se encontró ningún estudio realizado hasta la fecha relacionada con epilepsia. Si analizamos los genes encontrados en el análisis del transcriptoma tomando el genoma del hámster sirio como referencia, el gen *Slc2a5* codifica una proteína que es un transportador de fructosa, transmembrana y glucosa; alteraciones en la expresión de este gen se han correlacionado con enfermedades testiculares, linfocitosis hemofagocítica e hipertensión inducida por la fructosa (Thorens et al., 2004), aunque sin relación con epilepsia y convulsiones hasta la fecha. Según López-López et al., 2017, los genes *Egr* codifican factores de transcripción rápida y transitoria que regula una amplia gama de estímulos celulares (ambientales, fisiológicos, y estímulos patológicos). De los genes *Egr*, se ha descrito una sobre expresión del *Egr4* en ratas que presentan convulsiones inducidas por pilocarpina (Lösing et al., 2017). Según Basulto et al., 2018 hay una relación en la sobre-expresión de los genes

Egr1, *Egr2* y en la epilepsia; cabe mencionar que el gen *Egr4* no pudo ser validado en este estudio, por ello se recomienda realizar un nuevo diseño de primer para validar dicho gen.

7. CONCLUSIONES

Primera: Entre los genomas de referencia se encuentra doce genes similares con expresión diferencial idéntica para los dos análisis (*Atp2a3*, *C6*, *Egr1*, *Egr2*, *Egr3*, *Fos*, *Fosb*, *Junb*, *Npas4*, *Rxfp2*, *Slc28a1* y *Ttr*).

Segunda: El transcriptoma con referencia del genoma *Mesocricetus auratus* presento un mejor alineamiento por base, cobertura, porcentaje de homología y mayor sensibilidad en la detección del transcriptos; esto quiere decir que a nivel metodológico este es el genoma de referencia más idóneo para el estudio del hámster sirio GASH/Sal.

Tercera: Por medio de las RT-qPCR se validaron los genes *C6*, *Fos*, *Rxfp2*, *Slc28a1*, *Ttr*, *Pkm*, *Slc2a5*, y los genes *G3hbr8* y *Egr4* no fueron validados por problemas de diseño y amplificación.

Cuarta: Se observó una relación de los genes *C6*, *Fos*, *Ttr* y *Egr4* validados por RT-qPCR con la actividad epileptogénica y convulsiva.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Adams, J. (2008). Transcriptome: connecting the genome to gene function. *Nature Education*, 1(1):195.
2. Applegate, C., Pretel, S., & Piekut, D. (1995). The substantia nigra pars reticulata, seizures and Fos expression. *Epilepsy Res*, 20:31–39.
3. Barrera, B., Oliveira, J., López, D., Muñoz, L., Garcia, N., Sancho, C. (2016). Pharmacological validation of the genetic audiogenic seizure hamster (GASH:Sal) using several antiepileptics. *Epilepsy Behav.*, 28(3):413-25.
4. Bathgate, R., Ivell, R., Sanborn, B., Sherwood, O., Summers, R. (2006). International Union of Pharmacology LVII: recommendations for the nomenclature of receptors for relaxin family peptides. *Pharmacol Rev*, 58(1):7-31.
5. Berkovic, S., Scheffer, I. (1997). Epilepsies with single gene inheritance. *Brain Dev.*, 19(1):13-18.
6. Biosystems, A. (2008). Applied Biosystems Real-Time PCR Systems. Applied Biosystems Real-Time PCR Systems. California, USA: Applied Biosystems.
7. Buckingham, S., Ramos, T., Barnum, S. (2014). Complement C5-deficient Mice are Protected from Seizures in Experimental Cerebral Malaria. *Epilepsia*, 55:(12)137-142.
8. Carballosa, M., Muñoz, L., López, T., Pardal, M., Nava, E., Cabo, C., . . . López, D. (2013). EEG characterization of audiogenic seizures in the hamster strain GASH:Sal. *Epilepsy Research*, 106:318-325.
9. Cheuk, I., Shin, V., Siu, T., Sang, J., Ho, J., Chen, J., Kwong, A. (2015). Association of EP2 receptor and SLC19A3 in regulating breast cancer metastasis. *Am J Cancer Res*, 5(11): 3389–3399.
10. Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.*, 162(1):156-9.
11. Claassen, J., Albers, D., Schmidt, J., Marchis, G., Pugin, D., Falo, C., Badjatia, N. (2014). NONCONVULSIVE SEIZURES IN SUBARACHNOID HEMORRHAGE LINK INFLAMMATION AND OUTCOME. *Ann Neurol*, 75(5): 771–781.
12. Dailey, J., Jobe, P. (1985). Anticonvulsant drugs and the genetically epilepsy-prone rat. *Federation Proceedings*, 44(10):2640-2644.
13. Danober, L., Deransart, C., Depaulis, A., Vergnes, M. (1998). Pathophysiological mechanisms of genetic absence epilepsy in the rat. *Progress in Neurobiology.*, 55:27–57.
14. Doretto, C., Fonseca, C., Lobo, R., Terra, V., Oliveira, J., Garcia, C. (2003). Quantitative study of the response to genetic selection of the Wistar Audiogenic Rat strain (WARS). *Behavior Genetics*, 33:(33)-42.
15. Espy, M., Uhl, J., Sloan, L., Buckwalter, S., Jones, M., Vetter, E., Smith, T. (2006). Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin. Microbiol. Rev.*, 19:165–256.
16. Faingold, C., Marcinczyk, M., Casebeer, D., Randall, M., Arnerić, S., Browning, R. (1994). GABA in the inferior colliculus plays a critical role in control of audiogenic seizures. *Brain Res.*, 640(1-2):40-47.
17. Fisher, R., Emde, W., Blume, W., Elger, C. (2005). Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, 46(4):470-472.

18. Gautier, N., Glasscock, E. (2015). Spontaneous seizures in Kcna1-null mice lacking voltage-gated Kv1.1 channels activate Fos expression in select limbic circuits. *J Neurochem*, 135 (1): 157-64.
19. Hiroi, N., Marek, G., Brown, J., Ye, H., Saudou, F., et al. (1998). Essential role of the fosB gene in molecular, cellular, and behavioral actions of chronic electroconvulsive seizures. *J Neurosci.*, 18(17):6952-6962.
20. Huxtable, R., Laird, H. (1978). The prolonged anticonvulsant action of taurine on genetically determined seizure-susceptibility. *Can J Neurol Sci.*, 5(2):215-221.
21. Jennings, L., Arcila, M., Corless, C., Kamel, S., Lubin, I., Pfeifer, J., Smolkin, R. (2017). Guideline for Validation of Next-Generation Sequencing–Based Oncology Panels. *The journal of molecular diagnostic*, (3):341–365.
22. Kaltwaßer, B., Schulenburg, T., Beck, F., Klotz, M., Schäfer, K., et al. (2013). Developmental changes of the protein repertoire in the rat auditory brainstem: a comparative proteomics approach in the superior olivary complex and the inferior colliculus with DIGE and iTRAQ. *JouARNI of proteomics.*, 79:43-59.
23. Kandravicius, L., Balista P, P., Lopes, C., Ruggiero, R., Umeoka, E., Garcia, N., et al. (2014). Animal models of epilepsy: use and limitations. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 10:1693-1705.
24. Kanwal, S., Khan, F., Lonie, A., Sinnott, R. (2017). Investigating reproducibility and tracking provenance A genomic workflow case study. *BMC Bioinformatics*, (18): 337.
25. Kearney, J. (2017). Precision Medicine: NMDA Receptor–Targeted Therapy for GRIN2D Encephalopathy. *Epilepsy Curr*, 17(2): 112–114.
26. Kesner, R. (1966). Subcortical mechanisms of audiogenic seizures. *Experimental neurology*, 15(2):192-205.
27. Klein, D. (2002). Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends Mol. Med.*, 8:257–260.
28. Lewis NE, L. X. (2013). Genomic landscapes of Chinese hamster ovary cell lines as revealed by the *Cricetulus griseus* draft genome. *Nat Biotechnol*. 31(8):759-765.
29. Livak, K., Schmittgen, T. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4):402-408.
30. López, D., López, E., Herrero, J. (2016). Transcriptoma del núcleo desencadenante de las crisis epilépticas en el hámster GASH:Sal. Salamanca: Tesis Doctoral.
31. López, L., Gómez, R., López, D., Gómez, R., Herrero, M., García, G., López, D. (2017). Overexpression of the immediate-early genes *Egr1*, *Egr2*, and *Egr3* in two strains of rodents susceptible to audiogenic seizures. *Epilepsy & Behavior.*, 71(B): 226-237.
32. Lösing, P., Niturad, C., Har, M., Reckendorf, M., Schatz, T., Sinske, D., Knöll, B. (2017). Holger Lerche,2 Snezana Maljevic,2,3 and Bernd Knöll. *Mol Brain.*, 10: 30.
33. Martín, A. (2009). Neuroquímica de las crisis epilépticas en el hámster GASH: Sal adulto. Papel del cotransportador KCC2, rGABA_A, NOS y PrPc. Universidad Autónoma de Madrid.: Tesis doctoral.
34. Martín, J., Wang, Z. (2011). Next - generation transcriptome assembly . *Nat Rev Genet*, 12(10):671-82.
35. Mazureka, S., Bosche, B., Hugoc, F., Eigenbrodt, E. (2005). Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. *Seminars in Cancer Biology*, 15(4):300-308.
36. McCown, T., Greenwood, R., Frye G, G., & Breese, G. (1984). Electrically elicited seizures from the inferior colliculus: ¿a potential site for the genesis of epilepsy? *Experimental neurology*, 86(3):527-542.
37. McGettigan, W. (31 de jul. de 2015). Transcriptomics today: Microarrays, RNA-seq, and more. (T. C., Entrevistador)
38. Meldrum, B. (1975). Epilepsy and GABA-mediated inhibition. *Int Rev Neurobiol.*, 17:1–36.
39. Morest, D. (1986). Structural organization of the auditory pathways. In: Tower D, editor. *The Nervous System, Human Communication and Its Disorders*. *J Pharmacol Exp Ther*, 237(2): 478–485.
40. Müller, E. (1986). The membrane attack complex of complement. *Annu Rev Immunol*, 4:503-28.
41. Muñoz, L., Carballosa, M., Yanowsky, K., García, N., López, D. (2016). The genetic audiogenic seizure hamster from Salamanca: The GASH:Sal. *Epilepsy Behav.*, 71(B):181-192.
42. Muñoz, P., López, D. (2005). Establecimiento Caracterización de una línea de hámsteres sirios propensos a padecer convulsiones audiógenas. Salamanca: Muñoz de la Pascua.
43. Mychaleckyj, J., Havt, A., Nayak, U., Pinkerton, R., Farber, E., Concannon, P., Guerrant, R. (2017). Genome-Wide Analysis in Brazilians Reveals Highly Differentiated Native American Genome Regions. *Mol Biol Evol*, 34(3): 559–574.
44. Ottman, R. (2005). Analysis of genetically complex epilepsies. *Epilepsia*, 46(10):7-14.
45. Padro, E. (2010). Standardization of melting curve analysis for the detection of *Babesia* in ticks using nucleotide polymorphisms".
46. Promega. (2001). ImProm-II™ Reverse Transcription System. ImProm-II™ Reverse Transcription System. Fitchburg, Wisconsin, United States: Promega.
47. Quail, M., Smith, M., Coupland, P., Otto, T., Harris, S., Connor, T., et al. (2012). A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*, 13: 341.
48. Raisinghani, M., Faingold, C. (2005). 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*, 1032(1):131-140.
49. Rapaport, F., Khanin, R., Liang, Y., Pirun, M., Krek, A., Zumbo, P., et al. (2013). Comprehensive evaluation of differential gene expression analysis methods for RNA-seq data. *Genome Biol.*, 14:95.
50. Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., et al. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239:487-491.

51. Samoriski, G., Piekut, D., Applegate, C. (1998). Regional analysis of the spatial patterns of Fos induction in brain following flurothyl kindling. *Neuroscience*, 84:1209–1222.
52. Sánchez, B., Gomez, N., Batista, A., Hernández, N., Oliveira, J., et al. (2016). Morpho-functional alterations in the olivocochlear efferent system of the genetic audiogenic seizure-prone hamster GASH:Sal. *Epilepsy Behav* 2016, 10: 50.
53. Schena, M., Shalon, D., Davis, R., & Brown, P. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science.*, 270:467–70.
54. Schmittgen, T., Livak, K. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3:1101-1108.
55. Scientific, T. F. (2009). NanoDrop. NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer. Waltham, Massachusetts, Estados Unidos: Thermo Fisher Scientific.
56. Serikawa, T., Mashimo, T., Kuramoto, T., Voigt, B., Ohno, Y., Sasa, M. (2015). Advances on genetic rat models of epilepsy. *Exp Anim*, 64(1):1-17.
57. Spradling, D., Lumley, L., Robi, C., Meyerhoff, J., Dillman, H. (2011). Transcriptional analysis of rat piriform cortex following exposure to the organophosphonate anticholinesterase sarin and induction of seizures. *J Neuroinflammation*. 2011; 8: 83., 8: 83.
58. Storjord, E., Dahl, J., Landsem, A., Fure, H., Ludviksen, J., Wood, S., Brekke, O. (2015). Oculoleptomeningeal Amyloidosis associated with transthyretin Leu12Pro in an African patient. *J Neurol*, 262(1): 228–234.
59. Tabb, K., Boss, K., Williams, K., Weiss, J., Weinschenker, D. (2007). Rats bred for susceptibility to depression-like phenotypes have higher kainic acid-induced seizure mortality than their depression-resistant counterparts. *Epilepsy research*, 74:140–146.
60. Tchitchek, N., Safronetz, D., Rasmussen, A., Martens, C., Virtaneva, K., Porcella, S., Ebihara, H. (2014). Sequencing, Annotation and Analysis of the Syrian Hamster (*Mesocricetus auratus*) Transcriptome. *PLoS One.*, 9(11).
61. Thorens, B., Uldry, M. (2004). The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Pflug. Arch.*, 447, 480–489.
62. Vitek, J., Kalibera, T. (2011). Repeatability, reproducibility, and rigor in systems research. *ACM*, 33-38.
63. Wada, J., Teras, A., White, B., Jung, E. (1970). Inferior colliculus lesion and audiogenic seizure susceptibility. *Exp Neurol.*, 28:326–332.
64. Wang, Z., Gerstein, M., Snyder, M. (2009). RNA-Seq: una herramienta revolucionaria para la transcriptómica. *Nat. Rev. Genet*, 10: 57-63.
65. WHO. (2006). World Health Organization Neurological Disorders Report. 978:(92): 4:156336:9. Ginebra, Suiza.: ISBN.
66. Wong S, S., Fellowes, A., Doig, K., Ellul, J., Bosma, T. (2015). Assessing the clinical value of targeted massively parallel sequencing in a longitudinal, prospective population-based study of cancer patients. *Cancer*, (112):1411–1420.
67. Xiao, x., Ma, J., Wan, j., Wu, X., Li, P., Yao, L. (2014). Validation of suitable reference genes for gene expression analysis in the halophyte *Salicornia europaea* by real-time quantitative PCR. *Front Plant Sci* , 5: 788.
68. Yang, L., Long, C., Faingold, C. (2001). 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*, 171(1):147-152.
69. Yutsudo, N., Kamada, T., Kajitani, K., Nomaru, H., Katogi, A., Ohnishi, Y., Nakabeppu, Y. (2013). fosB-null mice display impaired adult hippocampal neurogenesis and spontaneous epilepsy with depressive behavior. *Neuropsychopharmacology*, 38(5):895-906.
70. Zhong Wang, M. G., Wang, Z., Gerstein, M., Michael, S. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*, 10 (1): 57-63