

AACACGTAATATCAGCACCATCTCGAATCTCTAACAGAACACGTAATATCAG
AACACGTAATATCAGCACCATCTCGAATCTCTAACAGAACACGTAATATCAG
AACACGTAATATCAGCACCATCTCGAATCTCTAACAGAACACGTAATATCAG
AACACGTAATATCAGCACCATCTCGAATCTCTAACAGAACACGTAATATCAG
AACACGTAATATCAGCACCATCTCGAATCTCTAACAGAACACGTAATATCAG
AACACGTAATATCAGCACCATCTCGAATCTCTAACAGAACACGTAATATCAG
AACACGTAATATCAGCACCATCTCGAATCTCTAACAGAACACGTAATATCAG
AACACGTAATATCAGCACCATCTCGAATCTCTAACAGAACACGTAATATCAG
AACACGTAATATCAGCACCATCTCGAATCTCTAACAGAACACGTAATATCAG
AACACGTAATATCAGCACCATCTCGAATCTCTAACAGAACACGTAATATCAG

Transcriptoma del núcleo desencadenante de las crisis epilépticas en el hámster GASH:Sal

Tesis Doctoral
2016

Daniel López López

Universidad de Salamanca

Directores:

Dolores E. López García
M. Javier Herrero Turrión



**INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y
LEÓN**

Laboratorio de Trastornos audiomotores

**Transcriptoma del núcleo desencadenante de las crisis
epilépticas en el hámster GASH:Sal**

Memoria presentada por Daniel López López para optar
al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca

Directores:

Dra. M^a Dolores E. López García

Dr. Manuel Javier Herrero Turrión

Salamanca 2016



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

Los abajo firmantes, Drs. Dña. M^a Dolores E. López García y D. Manuel Javier Herrero Turrión, miembros del Instituto de Neurociencias de Castilla y León

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado **“Transcriptoma del núcleo desencadenante de las crisis epilépticas en el hámster GASH:Sal”**, ha sido realizado bajo su dirección por D. Daniel López López, y reúne las condiciones necesarias de calidad y rigor científico para su exposición pública y defensa con el fin de optar al título de Doctor por la Universidad de Salamanca.

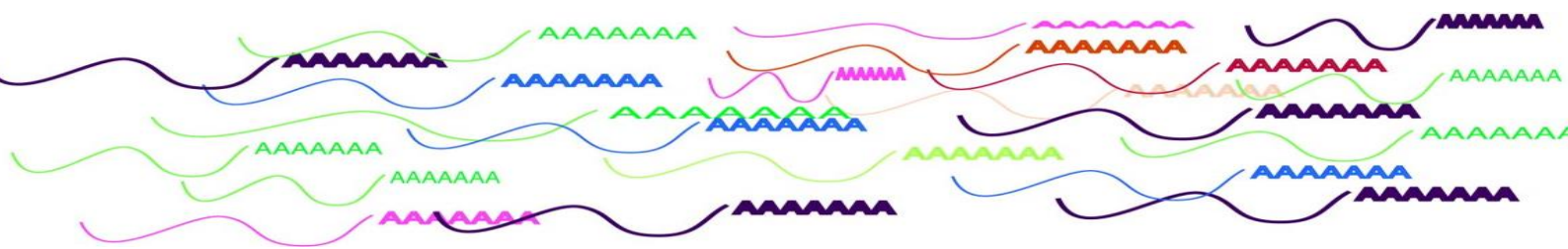
En Salamanca, a 8 de septiembre de 2016.

Fdo.:

Dra. M^a Dolores E. López

Fdo.:

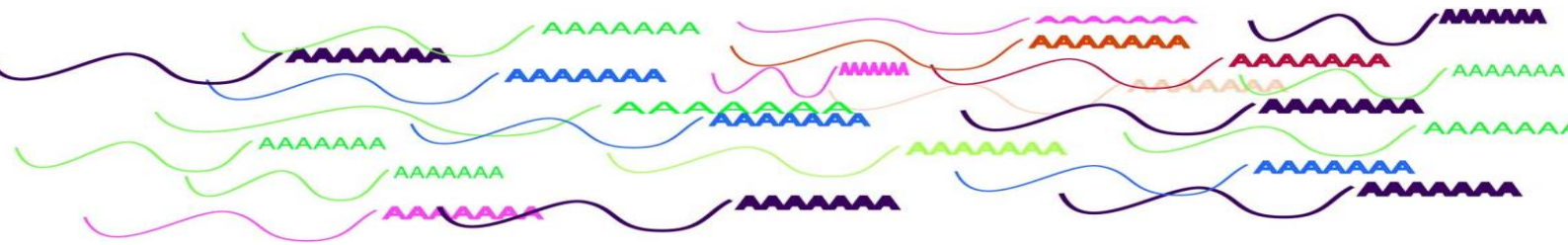
Dr. D. Manuel Javier Herrero Turrión



ÍNDICE

| Sección | Página |
|--|---------------|
| AGRADECIMIENTOS | 5 |
| ABREVIATURAS | 9 |
| LISTA DE FIGURAS Y TABLAS | 15 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 19 |
| 1.1 Generalidades. | 21 |
| 1.2 La epilepsia audiógena. | 22 |
| 1.3 El hámster GASH:Sal. | 24 |
| 1.4 El modelo de epilepsia audiógena de la rata WAR. | 25 |
| 1.5 Núcleos desencadenantes de las crisis convulsivas audiógenas. | 25 |
| 1.6 Bases genéticas de las epilepsias hereditarias | 28 |
| 1.7 Estudios de expresión génica. | 30 |
| 1.7.1. Microarrays de expresión. | 30 |
| 1.7.2. PCR en tiempo real. | 32 |
| 1.7.3. Transcriptoma. | 34 |
| 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 37 |
| 2.1 Hipótesis. | 39 |
| 2.2 Objetivos. | 40 |
| 3. DISEÑO EXPERIMENTAL | 41 |
| 4. MATERIALES Y MÉTODOS | 45 |
| 4.1 Animales de Experimentación. Grupos experimentales. | 47 |
| 4.2 Obtención del material biológico. | 49 |
| 4.2.1 Extracción del ARN del CI. | 49 |
| 4.2.2 Tratamiento de ARN total con ADNasa I, purificación y cuantificación del ARN. | 49 |
| 4.3 Transcriptómica. | 50 |
| 4.3.1 Generación de librerías RNA-seq. | 50 |
| 4.3.2 Secuenciación. | 51 |
| 4.3.3 Análisis de datos del transcriptoma. | 52 |
| 4.3.3.1 Análisis primario. Control de calidad del dato bruto. | 52 |
| 4.3.3.2 Análisis secundario. Mapeo y cuantificación de transcritos. | 52 |
| 4.3.3.3 Análisis terciario. Análisis de expresión. | 53 |
| 4.3.3.4 Estudio de enriquecimiento funcional. | 55 |
| 4.4 Anotación de los datos del transcriptoma. | 56 |
| 4.5 Correlaciones génicas y funcionales de los genes diferenciales del transcriptoma. | 56 |
| 4.6 Validación de genes diferencialmente expresados en el análisis del transcriptoma mediante RT-qPCR. | 57 |
| 4.6.1 Análisis estadísticos. | 62 |

| Sección | Página |
|--|---------------|
| 5. RESULTADOS | 65 |
| 5.1 Envío de las secuencias de los transcriptomas del CI del hámster sirio Control y del de la línea GASH:Sal a bases de datos online. | 67 |
| 5.2 Análisis de la expresión diferencial del transcriptoma del CI de la línea de hámster sirio GASH:Sal en comparación con el del hámster control. | 68 |
| 5.3 Clasificaciones funcionales y correlaciones de los genes diferencialmente expresados en la línea de hámster sirio GASH:Sal en comparación con la de los hámsteres control. | 73 |
| 5.3.1 Funciones moleculares. | 73 |
| 5.3.2 Componentes celulares. | 75 |
| 5.3.3 Procesos biológicos. | 76 |
| 5.3.4 Tipos de proteínas. | 78 |
| 5.3.5 Rutas metabólicas. | 79 |
| 5.3.6 Redes de interacciones. | 82 |
| 5.4 Genes diferencialmente expresados en la comparación entre el transcriptoma del CI del hámster sirio GASH-Sal y el de su control relacionados con procesos epilépticos. | 85 |
| 5.5 Validación por RT-qPCR de algunos de los genes diferencialmente expresados en la línea de hámster sirio GASH:Sal en comparación con la de los hámsteres control. | 89 |
| 5.6 Comparación de la expresión génica del CI tras una crisis epiléptica con el modelo de epilepsia audiógena WAR. | 90 |
| 6. DISCUSIÓN | 93 |
| 6.1 Discusión metodológica y consideraciones técnicas. | 95 |
| 6.1.1 Técnicas de Biología Molecular. | 95 |
| 6.2 Análisis de genes diferencialmente expresados en el transcriptoma. | 97 |
| 6.3 Expresión de genes relacionados con procesos epileptógenos. | 104 |
| 6.4 Sobreexpresión de los genes de expresión temprana Egr1, Egr2 y Egr3 en dos líneas de roedores con epilepsia audiógena. | 108 |
| 7. CONCLUSIONES | 117 |
| 8. BIBLIOGRAFÍA | 121 |
| 9. ANEXOS | 145 |



AGRADECIMIENTOS

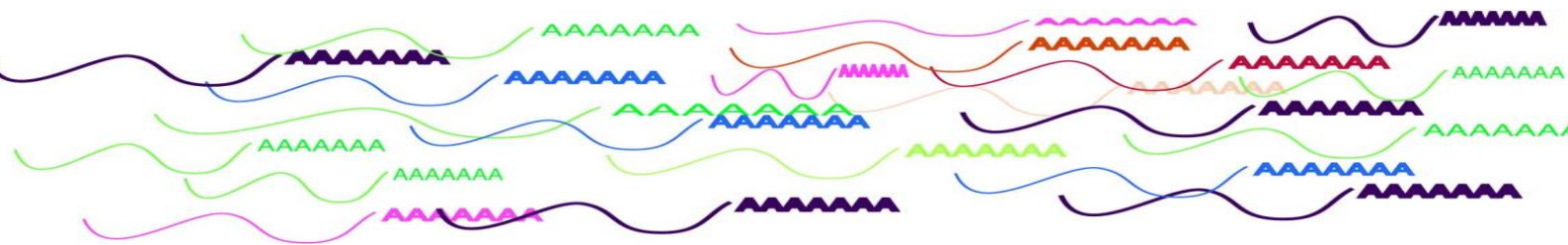
Me gustaría comenzar agradeciendo a mis directores de tesis, M. Javier Herrero Turrión y Dolores E. López García, su atención, paciencia, dedicación y confianza, porque sin su ayuda y espectacular capacidad como profesores y profesionales, este texto no hubiera llegado nunca a ser lo que es, o llegado a existir. Sin su entrega para sumarse a la mía propia, hubiera estado perdido y sin esperanza.

A todos los miembros del laboratorio del INCYL, Orlando, Ricardo, David, Sonia y Lymarie, no sólo por su imprescindibles ayuda y apoyo, sino también por su capacidad para acogerme como un miembro más, uno demasiado ausente, de su familia y por hacerme sentir parte de su grupo de una forma tan natural, que muchas veces he creído haberlo sido desde siempre.

A mi familia, por su apoyo en los momentos duros, siempre dispuesta a descansar un poco menos o salir del camino marcado para ayudarme. Una ayuda a veces dada por sentada, pero que sin la que no nunca habría podido seguir adelante.

A Valentina por su apoyo, comprensión y ayuda siempre que necesito algo, incluido darme un lugar seguro en el que poder sacar la frustración y cansancio de mi cuerpo para poder seguir adelante.

A mis padres, por todo.



ABREVIATURAS

Abcc2: *ATP binding cassette subfamily C member 2.*

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNasa: desoxirribonucleasa.

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario.

Aldh1a2: *Aldehyde dehydrogenase 1 family member A2.*

AMG: amígdala.

Ano3: *Anoctamin 3.*

ANOVA: análisis de la varianza.

Arc: *Activity-regulated cytoskeleton-associated protein.*

ARN: ácido ribonucleico.

ARNasa: ribonucleasa.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

ARNr: ácido ribonucleico ribosómico.

Asb14: *Ankyrin repeat and SOCS box containing 14.*

Atp2a3: *Atpase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺ transporting 3.*

Bace2: *Beta-site APP-cleaving enzyme 2.*

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

Bp: par de base.

C1s: *Complement component 1, s subcomponent.*

C6: *Complement component 6.*

Car3: *Carbonic anhydrase 3.*

Cav1: *Caveolin 1.*

CCA: crisis convulsivas audiogénicas.

Cd163: *CD163 antigen.*

CDCI: corteza dorsal del colículo inferior.

Cdkl5: *cyclin dependent kinase like 5.*

CECI: corteza externa del colículo inferior.

CGM: cuerpo geniculado medial.

CI: colículo inferior.

Cmya5: *Cardiomyopathy associated 5.*

COS: complejo olivar superior.

CPCS: capas profundas del colículo superior.

Ct: ciclo umbral. Del inglés *cycle threshold.*

CTD: Del inglés *Comparative Toxicogenomics Database.*

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

Dcdc5: *Doublecortin domain-containing protein 5.*

Dcn: *Decorin.*

Dnm1: *Dynamin 1.*

dNTP: desoxinucleótidos trifosfato.

EEG: encefalograma.

EGI: iniciativa de genética de la epilepsia. Del inglés *Epilepsy Genetics Initiative.*

Egr1: *Early growth response 1.*

Egr2: *Early growth response 2.*

Egr3: *Early growth response 3.*

Fabp7: *Fatty acid binding protein 7.*

Fat3: *FAT atypical cadherin 3.*

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

Fhl2: *Four and a half LIM domains 2.*

Fos: *Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit.*

Fosb: *FosB proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit.*

Fosl2: *FOS like 2, AP-1 transcription factor subunit.*

FRP: formación reticular pontina.

GABA: ácido gamma-aminobutírico.

Gabra1: *Gamma-aminobutyric acid type A receptor α 1 subunit.*

Gabra4: *Gamma-aminobutyric acid type A receptor α 4 subunit.*

Gadd45g: *Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma.*

Gadph: gliceraldehido 3-fosfatasa.

GAERS: epilepsia de ausencia genética en ratas de Estrasburgo.

GASH:Sal: del inglés *Genetic audiogenic seizures hámster: Salamanca.*

GEPRs: del inglés *genetically epilepsy-prone rats.*

Gng13: *Guanine nucleotide binding protein subunit gamma 13.*

Gpr83: *G protein-coupled receptor 83.*

Gpr98: *Adgrv1; Adhesion G protein-coupled receptor V1.*

Grin2c: *Glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2C.*

GTP: guanosín trifosfato.

Hcn1: *hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated potassium channel 1.*

Igfn1: *Immunoglobulin-like and fibronectin type III domain containing 1.*

Islr: *Immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat.*

Junb: *Proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit.*

Kcnc1: *potassium voltage-gated channel subfamily C member 1.*

KEGG: enciclopedia de genes y genomas de Kioto, *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.*

Krt19: *Keratin, type I cytoskeletal 19.*

LTD: depresión a largo plazo. Del inglés, *long term depression.*

Lum: *Lumican.*

Mkp3: *MAP kinase phosphatase 3.*

Mybpc3: *Myosin binding protein C, cardiac.*

Myo15: *Myosin XVA.*

Myom1: *Myomesin 1.*

n.s.: no significativo.

NC: núcleo coclear.

NCBI: centro nacional de información biotecnológica. Del inglés *National Center for Biotechnology Information.*

NCCI: núcleo central del colículo inferior.

NLL: núcleo del lemnisco lateral.

Npas4: *Neuronal PAS domain protein 4.*

Nup155: *Nucleoporin 155kda.*

Ogn: *Osteoglycin.*

PANTHER: análisis proteico a través de las relaciones evolutivas.

del inglés *Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships.*

Pcdh7: *Protocadherin 7.*

Qars: *glutaminyl-tRNA synthetase.*

Rab29: *Member RAS oncogene family.*

Rem2: *RRAD and GEM like gtpase 2.*

Rnf125: *Ring finger protein 125, E3 ubiquitin protein ligase.*

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

SEM: error estándar de la media. Del inglés, *standard error of the mean.*

Sertad1: *SERTA domain containing 1.*

Sfrp2: *Secreted frizzled related protein 2.*

Slc13a4: *Solute carrier family 13 (sodium/sulfate symporter), member 4.*

Slc22a12: *Solute carrier family 22 (organic anion/cation transporter), member 12.*

Slc28a1: *Solute carrier family 28 (concentrative nucleoside transporter), member 1.*

Slc6a12: *Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 12.*

Slc6a13: *Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, GABA), member 13.*

Slitrk6: *SLIT and NTRK like family member 6.*

Sng1: *Nonsense mediated ARNm decay associated PI3K related kinase.*

SNC: sistema nervioso central.

SNR: porción reticular de la sustancia negra.

SPG: sustancia gris periacueductal.

Stx1b: Syntaxin 1B.

Tbc1d24: TBC1 domain family member 24.

Thbs1: *Thrombospondin-1.*

Tmsb15b: *Thymosin beta 15B.*

Tph2: *Tryptophan 5-hydroxylase 2.*

Traf5: *TNF receptor associated factor 5.*

Ttr: *Transthyretin.*

VCF: del inglés *Variant Call Format.*

Vcl: *Vinculin.*

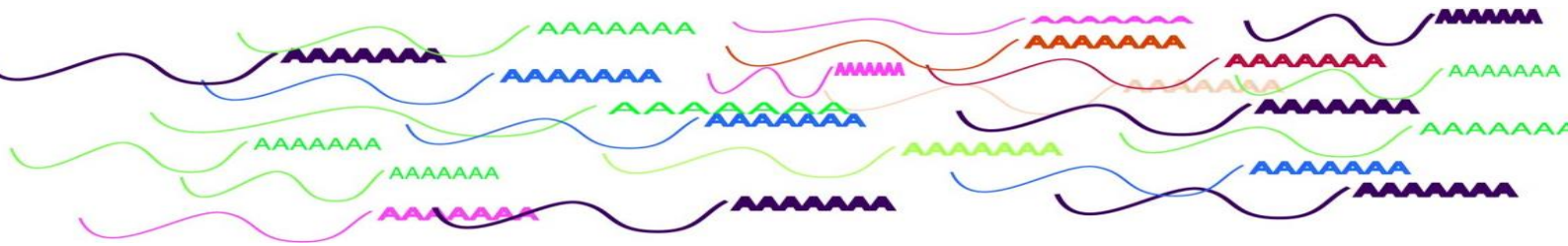
WAG/Rij: del inglés *Wistar Albino Glaxo/Rij-rat.*

WAR: rata audiogénica Wistar.

Del inglés, *Wistar Audiogenic Rat.*

Wnk4: *WNK lysine deficient protein kinase 4.*

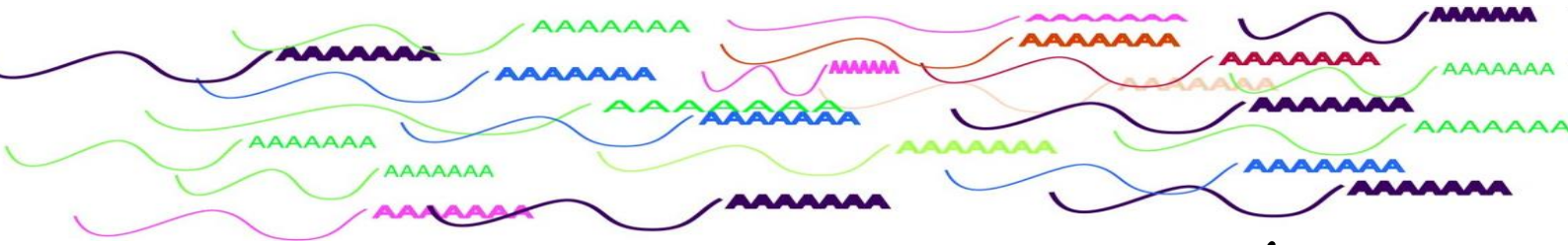
β -act: β -actina.



LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

| Elemento | Descripción | Página |
|------------------|--|---------------|
| <i>Figura 1</i> | Esquema de los núcleos implicados en el desencadenamiento de las crisis convulsivas audiógenas. | 27 |
| <i>Figura 2</i> | Esquema de técnica de microarray para comparación de dos muestras. | 31 |
| <i>Figura 3</i> | Esquema explicativo sobre la reacción en cadena de la polimerasa. | 33 |
| <i>Figura 4</i> | Esquema explicativo sobre la metodología de obtención del transcriptoma. | 35 |
| <i>Figura 5</i> | Esquema explicativo de la base de la técnica de RNA-seq. | 36 |
| <i>Figura 6</i> | Diseño experimental. | 44 |
| <i>Figura 7</i> | Análisis espectrográfico de una muestra de RNA en el NanoDrop. | 50 |
| <i>Figura 8</i> | Illumina Genome Analyzer IIx. | 51 |
| <i>Figura 9</i> | Ajuste del modelo teórico con los valores experimentales. | 54 |
| <i>Figura 10</i> | Gráfico del nivel de expresión medio de los genes del transcriptoma. | 55 |
| <i>Figura 11</i> | Representación de valores logarítmicos de fluorescencia vs nº de ciclos. | 59 |
| <i>Figura 12</i> | Gráfico del cálculo de los Ct obtenidos para cada concentración. | 60 |
| <i>Figura 13</i> | Curva de desnaturalización de un grupo de muestras. | 61 |
| <i>Figura 14</i> | Detalle del portal de envíos del NCBI. | 67 |
| <i>Figura 15</i> | Diagrama de la variación del tamaño de la muestra de estudio. | 69 |
| <i>Figura 16</i> | Lista de genes después de aplicar los criterios estadísticos $p \leq 0.05$ y $FC \geq 2$. | 70 |
| <i>Figura 17</i> | Gráfico de dispersión del FC de la expresión de los genes de la muestra. | 72 |
| <i>Figura 18</i> | Distribución porcentual de las diferentes categorías funcionales de las proteínas codificadas por los genes diferencialmente expresados del anexo I. | 74 |
| <i>Figura 19</i> | Distribución porcentual de las diferentes categorías subcelulares de las proteínas codificadas por los genes diferencialmente expresados del anexo I. | 75 |
| <i>Figura 20</i> | Distribución porcentual de los diferentes procesos biológicos en los que participan las proteínas codificadas por los genes diferencialmente expresados del anexo I. | 76 |
| <i>Figura 21</i> | Distribución porcentual de los diferentes tipos de proteínas codificadas por los genes diferencialmente expresados del anexo I. | 78 |
| <i>Figura 22</i> | Esquema de coincidencias entre las rutas metabólicas con mayor número de genes asociados. | 82 |
| <i>Figura 23</i> | Red de interacciones entre las proteínas de los genes del estudio. | 83 |
| <i>Figura 24</i> | Red de interacciones entre las proteínas de los genes incluidos en las 7 rutas metabólicas con más número de genes asociados. | 85 |
| <i>Figura 25</i> | Confirmación a nivel de expresión génica de los resultados. | 89 |
| <i>Figura 26</i> | FC de la expresión de la transcripción de genes Egr, en GASH:Sal, WAR y controles. | 91 |
| <i>Figura 27</i> | Esquema resumen de relación entre genes Egr y diferentes procesos. | 113 |
| <i>Figura 28</i> | Detalle de la red de interacciones entre las proteínas de los genes del estudio estricto del transcriptoma. | 115 |

| Elemento | Descripción | Página |
|-----------------|--|---------------|
| <i>Tabla 1</i> | Cebadores de PCR utilizados para la técnica de análisis de expresión génica. | 63 |
| <i>Tabla 2</i> | Lista de los nombres de los 58 genes diferencialmente expresados e identificados. | 71-72 |
| <i>Tabla 3</i> | Lista de genes incluidos en las categorías de funciones moleculares. | 74 |
| <i>Tabla 4</i> | Lista de genes incluidos en las categorías de componentes celulares. | 75 |
| <i>Tabla 5</i> | Lista de genes incluidos en las categorías de procesos biológicos. | 77 |
| <i>Tabla 6</i> | Lista de genes incluidos en las categorías de tipos de proteína. | 79 |
| <i>Tabla 7</i> | Rutas metabólicas en las que se clasificaron las proteínas analizadas con el número de proteínas asociadas a cada una. | 80 |
| <i>Tabla 8</i> | Lista de genes incluidos en las 7 rutas metabólicas con más genes asociados. | 80 |
| <i>Tabla 9</i> | Resultado del test de sobre-representación estadística realizado en PANTHER con los datos de rutas metabólicas como objeto. | 81 |
| <i>Tabla 10</i> | Lista de genes encontrados en las tres búsquedas anteriores que cumplen al menos uno de los criterios de valor de FC y significación de p. | 86 |
| <i>Tabla 11</i> | Lista de genes resultantes de la búsqueda cruzada entre los genes de la lista de la EGI y los identificados en las búsquedas relacionadas en los fenotipos asociados. | 87 |
| <i>Tabla 12</i> | Rutas metabólicas asociadas al grupo de genes coincidentes entre la lista de la EGI y la de genes de expresión y el número de proteínas implicadas en cada una de ellas. | 88 |
| <i>Tabla 13</i> | Nivel de expresión del gen GABRa4 en el CI de GASH:Sal y WAR y sus respectivos controles, medidos mediante RT-qPCR. | 92 |



1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades.

El término epilepsia, del griego "epilhyia", significa, ser "agarrado", "atacado" o "atrapado". Como muchas enfermedades asociadas al sistema nervioso, la epilepsia fue considerada durante años como un síntoma de posesión demoniaca hasta finales de 1800 principios de 1900, cuando el "padre de la epilepsia" John Hughlings Jackson (1835-1911), enunció un origen científico para esta enfermedad, desbancando a las explicaciones sobrenaturales [García-Albea, 1999]. La epilepsia es una de las patologías más comunes del cerebro [WHO, 2006] y afecta, aproximadamente, al uno por ciento de la población, incluyendo a personas de todas las edades, representando un importante problema de salud pública.

Se define conceptualmente como un "trastorno del cerebro caracterizado por una predisposición permanente para generar ataques epilépticos" [Fisher y cols., 2014]. La comunicación entre neuronas se regula a través de un equilibrio entre señales inhibitorias y excitatorias; cuando este equilibrio sufre alteraciones, ya sea por sobreexcitación o por reducción de la inhibición, pueden producirse descargas descontroladas de impulsos excitatorios que produzcan 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 (SNC), 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 y cols., 2012]. Estas descargas pueden producirse en diferentes regiones del cerebro, originando convulsiones, que pueden ir desde episodios muy breves de ausencia o de contracciones musculares hasta convulsiones prolongadas y graves, pérdida de consciencia y del control de esfínteres, producto de una actividad excitatoria (a nivel celular) anormal o excepcional del SNC.

Desde el punto de vista clínico, se han definido más de 40 tipos de epilepsias en los humanos [ILAE, 1989]; entre ellas, las epilepsias reflejas, son

provocadas por un estímulo sensorial específico y la sufren aproximadamente el 6% de los pacientes epilépticos [Salas-Puig y cols., 2000]. Su identificación necesita una anamnesis dirigida y un estudio electroencefalográfico (EEG), con exposición al estímulo que confirme el diagnóstico.

El conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares subyacentes a los distintos tipos de epilepsias es todavía limitado, y parece probable que se lleguen a identificar numerosos tipos más, a medida que este conocimiento se amplíe.

Aunque sólo en un pequeño porcentaje de las epilepsias humanas se ha identificado un componente genético, se considera que la susceptibilidad genética estaría implicada en más de un tercio de las epilepsias, o como sugieren otros datos, existiría un componente hereditario complejo en todas las formas de epilepsia [Ottman, 2005]. Se considera que al menos seis síndromes de epilepsia humana pueden ser causados por herencia monogénica [Berkovic y Scheffer, 1997].

Mucho de lo que hoy se conoce sobre la epilepsia se debe a los modelos animales sobre esta enfermedad [Fisher y cols., 2005]. Los modelos experimentales ensayados han sido múltiples, desde la inducción mediante el uso de drogas convulsivantes, privación de metabolitos o estimulación eléctrica [Kandratavicius y cols., 2014], hasta el uso de modelos animales con predisposición genética a padecer este tipo de trastorno [Serikawa y cols., 2015].

1.2 La epilepsia audiógena.

En 1884, Merzheevsky fue el primero en registrar, en la especie humana, un caso de crisis inducidas por la música, acuñando Critchley el término de "epilepsia musicogénica". Este tipo de epilepsia está encuadrada en la categoría de crisis reflejas. Es poco frecuente en la especie humana, y la naturaleza del estímulo sonoro epileptógeno es variable, teniendo también

un componente emocional en el desencadenamiento de la crisis [Salas-Puig y cols., 2000].

En otros vertebrados, las crisis inducidas por sonido reciben el nombre de “crisis convulsivas audiógenas” (CCA) [Salas-Puig y cols., 2000]. Mientras que en la especie humana “la epilepsia musicogénica” es sintomática y focal, a veces con generalización secundaria, en otros mamíferos estudiados estas crisis adoptan la forma de crisis idiopáticas generalizadas tónico-clónicas [Seyfried, 1979; Ross y Coleman, 2000].

Los primeros estudios sobre las crisis audiogénicas en animales se llevaron a cabo en laboratorio Dr. Pavlov en 1924 en San Petersburgo y, posteriormente, en el Instituto Wistar de Filadelfia [Krushinsky y cols., 1970]. La cepa Krushinsky-Molodkina [Krushinsky, 1979] surgió a partir de un modelo animal experimental desarrollado partiendo de ratas Wistar. Otra línea derivada de rata Sprague-Dawley, las ratas genéticamente propensas a epilepsia (GEPRs) [Dailey y Jobe, 1985], fue inicialmente desarrollada en la Universidad de Arizona, EE.UU. y poseen fenotipos de diferente gravedad, propiedad de la Universidad de Illinois, en los EE.UU. [Carvalho, 2007].

En la actualidad, los animales con crisis audiógenas constituyen uno de los modelos experimentales más empleados para el estudio e identificación de los mecanismos que subyacen en la epilepsia [Seyfried, 1979; Ross y Coleman, 2000]. Según la clasificación descrita por la ILAE en 1988, las 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. La mayoría de animales que sufren CCA presentan un patrón similar en el desarrollo de sus crisis [Carballosa, 2008]. Los individuos propensos a padecer CCA presentan estos eventos en forma de crisis clónicas o tónico-clónicas [Ross y Coleman, 2000]. Al igual que las crisis fotosensibles, se engloban en la categoría de crisis del tronco del encéfalo [Carballosa-González y cols., 2013]. 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.

1.3 El hámster GASH:Sal.

El modelo animal para este estudio, el hámster GASH:Sal (*Genetic audiogenic seizure hámster: Salamanca*) [Muñoz y López, 2005; Muñoz y cols., 2016], es una línea desarrollada en Salamanca a partir de una línea originaria de la Universidad de Valladolid. Esta línea, presentan una epilepsia audiógena de origen genético, similar a la epilepsia de tipo Gran Mal que aparece en la especie humana y que presenta un patrón de herencia autosómica recesiva para la susceptibilidad audiógena [Muñoz y López, 2005; Muñoz y cols., 2016]. Al igual que en otros modelos animales de CCA [Ross y Coleman, 2000], las convulsiones se producen como consecuencia de un estímulo auditivo intenso, a partir de los 18 días de edad, momento en el que se completa la maduración del sistema acústico. La susceptibilidad alcanza su grado máximo entre el primer y cuarto mes, para posteriormente desaparecer gradualmente.

Durante los últimos años, hemos caracterizado la clínica de las crisis, el patrón de transmisión [Muñoz y cols., 2016], las características neuroquímicas y neuroanatómicas de estos animales [Fuentes-Santamaría y cols., 2005, 2007 y 2008; Prieto-Martín y cols., 2012 y 2016; Sánchez-Benito y cols., 2016] y tipificado las crisis convulsivas como verdaderas crisis epilépticas [Carballosa y cols., 2013]. También se ha observado que responden a fármacos antiepilépticos, tanto clásicos [Barrera-Bailón y cols., 2013], como de nueva generación [Barrera-Bailón y cols., 2016], lo que les acredita como verdaderos modelos de epilepsia.

1.4 El modelo de epilepsia audiogénica de la rata WAR.

Uno de los modelos más afines al hámster GASH:Sal, lo constituye la rata WAR (*Wistar Audiogenic Rat*), originada mediante la cría selectiva de ratas Wistar susceptibles a crisis audiogénicas en la escuela de medicina de Riberão Preto de Brasil. Cuando se somete a estos animales a un estímulo sonoro de gran intensidad (120dB SPL) desarrollan una convulsión generalizada de tipo tónico-clónica seguida de espasmos clónicos [Kiesmann y cols., 1988; Doretto y cols., 2003]. La susceptibilidad audiogénica de esta cepa, se verifica a los setenta días de edad, momento en el que tienen una respuesta más estable [Doretto y cols., 2003; Carvalho, 2007].

Los estudios con animales de esta cepa comenzaron en la década de los 80 y, desde entonces, las ratas WAR se han utilizado en investigaciones sobre la etología de las crisis, efectos de estimulación sonora crónica, plasticidad neuronal, alteraciones cardíacas durante las crisis, fármacos antiepilépticos, efecto de la manipulación GABAérgica, etc. [García-Cairasco y cols., 1996; Doretto y cols., 1998; Beraldo y cols., 2004; Pimenta, 2004; Rosetti y cols., 2011; Grangeiro y cols., 2016].

1.5 Núcleos desencadenantes de las crisis convulsivas audiogénicas.

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. Algunos autores postulan que el foco epileptogénico puede ser un núcleo de las vías sensoriales; en el caso de la vía auditiva, el colículo inferior (CI), y al desencadenarse varias crisis, este foco puede reclutar otras áreas (transformándolas en focos secundarios) de las zonas superiores [García-Cairasco, 2002; Romcy-Pereira y Cairasco, 2003; Faingold, 2004; de Cabo de la Vega y cols., 2006].

El sistema auditivo de los mamíferos está formado por una amplia red de núcleos interconectados gracias a los cuales la información del sonido se transmite y se integra. Las neuronas del CI integran información ascendente, (que converge desde núcleos auditivos inferiores situados en el tronco del encéfalo) así como descendente [Kaltwaßer y cols., 2013]. Son varios los estudios que evidencian la relevancia del CI en la iniciación de las CCA, ya que se ha comprobado que su destrucción bilateral en ratas y ratones con CCA, anula las crisis audiógenas [Kesner, 1966; Browning, 1986]. Estudios electrofisiológicos en ratones DBA (susceptibles a padecer crisis audiógenas) indican anomalías en la respuesta neuronal del CI, restringidas principalmente a la porción ventral del núcleo central del CI [Martín, 2009]. Además, se ha comprobado que la estimulación eléctrica o química del CI desencadena crisis epilépticas [McCown y cols., 1984]. Otros autores han inyectado aminoácidos en el CI, que actúan como neurotransmisores inhibitorios, como glicina y taurina, observándose también una inhibición de las crisis [Huxtable y Laird, 1978]. Por un lado, a través del colículo superior se activan núcleos motores, mientras que la sustancia gris periacueductal provoca el desencadenamiento de las fases clónico tónicas a través de la médula espinal [Faingold y cols., 1994]. En el periodo postictal, se activa la formación reticular pontina [Yang, 2001]. Se ha visto que otras regiones como el sistema olivococlear, el propio receptor auditivo, la amígdala o la corteza auditiva [Raisinghari y Faingold, 2005] también podrían estar implicadas en las crisis.

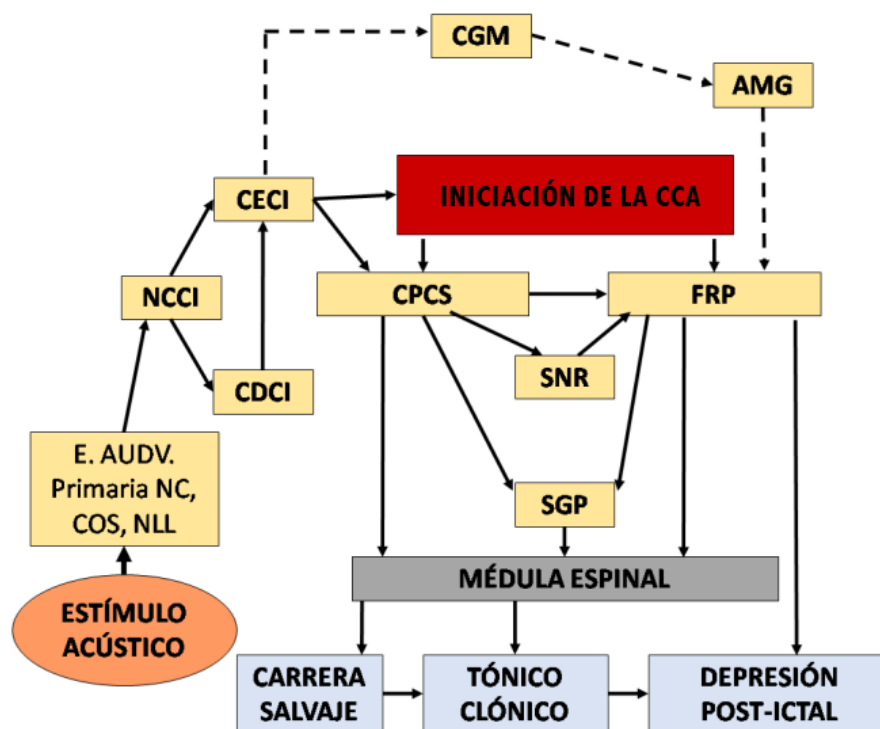


Figura 1. Esquema de los núcleos implicados en el desencadenamiento de las crisis convulsivas audiógenas y los comportamientos que subyacen a la crisis (Modificado de Faingold, 2004). Cada aspecto comportamental está controlado por un núcleo específico durante la crisis: El NCCI inicia la CCA mientras 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 audiógenas; 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.

En el GASH:Sal, al igual que en otros modelos de epilepsia audiógena [Willot y Lu, 1980; Ross y Coleman, 2000; Faingold, 2004], la activación de la vía auditiva es crucial para el desencadenamiento de la crisis, y el CI, juega un papel fundamental en su iniciación [Carballosa González, 2008].

La ILAE define las crisis epilépticas como un acontecimiento ictal que representa un mecanismo patofisiológico y sustrato anatómico único [Fisher y cols., 2005]. En este sentido, buscar el sustrato molecular responsable de la etiología epiléptica contribuiría a desarrollar estrategias más eficaces para bloquear las crisis. También sería de gran ayuda para la consolidación

de la línea de hámsteres GASH:Sal como un nuevo modelo de epilepsia que pueda contribuir al avance en el estudio de esta enfermedad.

1.6 Bases genéticas de las epilepsias hereditarias.

La epilepsia es una enfermedad que origina convulsiones repetitivas que se producen después de una gran variedad de alteraciones en el sistema nervioso. Se han descrito algunas epilepsias de origen genético, relacionándose con mutaciones en genes con funciones muy heterogéneas. Por ejemplo, se ha asociado la incidencia de espasmos infantiles con mutaciones del gen *Cdk15*, gen que codifica una proteína kinasa, situada en el cerebro y que interviene en la maduración neuronal y en la sinaptogénesis [Moseley y cols., 2012]. También se han descrito otros genes mutados implicados en epilepsias humanas hereditarias que codifican canales iónicos (*Ano3*, *Hcn1*, *Kcnc1*), proteínas de unión a GTP relacionadas con endocitosis (*Dnm1*), con el tráfico entre membranas (*Stx1b*, *Tbc1d24*), proteínas de membrana implicadas en el reconocimiento y adhesión celular (*Pcdh7*), en el desarrollo cerebral (*Qars*) y subunidades del receptor GABA (*Gabra1*) [Helbig 2014, 2015; ILAE 2014; Johannesen y cols., 2016].

Los modelos animales de epilepsia de origen genético constituyen también otra herramienta, no sólo para investigación con fármacos, sino también para contribuir al conocimiento de la etiología de la epilepsia. Entre los modelos de ratones que existen en la naturaleza (no transgénicos), se incluye el DBA/2J, ratón tambaleante, letárgico o “*stargazer*” (denominado así por los movimientos característicos de su cabeza) [Felix, 2002], y suelen estar asociados a alteraciones monogénicas de genes codificantes de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje [Burgess y cols., 1997; Noebels y cols., 1990], mientras que fenotipos similares en el humano suelen estar asociados a alteraciones de varios genes [Hughes, 2009]. En ratas, los principales modelos genéticos son las GAERS (Epilepsia de ausencia genética en ratas de Estrasburgo) y las WAG/Rij (Wistar Albino Glaxo/Rij-rat). Ambos

modelos presentan mutaciones poligénicas que afectan a los canales de Ca^{2+} tipo T y a los genes que codifican los receptores dopaminérgicos D1 y D2 [Jones y cols., 2011], asemejándose más que los modelos de ratón a las epilepsias idiopáticas humanas [Avoli M, 2012; van Luijtelaar y cols., 2002]. Recientemente, se está haciendo hincapié en la idea de que la propia actividad ictal y la actividad inter-ictal influyen en los cambios estructurales y funcionales que conducen a la hiperexcitabilidad y la hiperconectividad. Consistente con esta idea, los genes que codifican receptores de neurotransmisores, canales iónicos, factores de transcripción y factores neurotróficos, se han encontrado diferencialmente expresados en varios modelos animales de epilepsia y en tejido epiléptico cerebral humano [Coulter, 2001; Becker y cols., 2003; Rakhade y cols., 2005; Sanjay y cols., 2005].

Esta plasticidad sináptica dependiente de la actividad cerebral, se conoce bien en modelos de aprendizaje y memoria donde, por ejemplo, la activación de adenosil monofosfato cíclico en respuesta a la unión de una determinada proteína por la actividad neuronal, origina cambios en la expresión génica que conducen al refuerzo y a la estabilización de más circuitos neuronales [Herdegen y Leah, 1998; Kandel, 2001].

Acorde con esto, en el foco epileptógeno de pacientes con epilepsia neocortical, se ha observado la inducción de la expresión local y constante de un determinado grupo de genes, los de inducción temprana, como *c-fos*, *Egr1*, *Egr2* y *Mkp3* [Sanjay y cols., 2005]. Estos genes median cambios de larga duración en la estructura neuronal y excitabilidad a través de la inducción de la expresión de genes adicionales que incitan cambios estructurales para mejorar la transmisión sináptica [Herdegen y Leah, 1998]. No se ha observado ninguna relación entre la frecuencia de las crisis y los niveles de expresión de estos genes en los diferentes pacientes examinados, pero sí hay una relación significativa entre la expresión de algunos de ellos (*c-fos*, *Egr1* y *Egr2*) y la frecuencia, amplitud, y área total de las ondas inter-ictales registradas en el foco epileptógeno [Rakhade y cols., 2007].

1.7 Estudios de expresión génica.

1.7.1. Microrrays de expresión.

Los microarrays de expresión de alta densidad de oligonucleótidos, fueron presentados en 1983 [Chang, 1983] y son utilizados en aplicaciones tanto cuantitativas (medida de expresión), como cualitativas (a nivel diagnóstico) [Miller y Tang, 2009]. En su aplicación cuantitativa, la más ampliamente utilizada, se emplean para medir la señal de expresión a nivel genómico-transcriptómico de miles de genes expresados en una muestra dada. Por esto, se tratan de dispositivos capaces de realizar mediciones de la cantidad de ARNm (ácido ribonucleico mensajero) correspondiente a miles de genes presentes en la muestra analizada. Para conseguir esto, se utiliza la técnica de hibridación específica ARN-ADN (ácido desoxirribonucleico).

Uno de los microarrays más utilizados es el de genoma completo, como el de Affymetrix, microarrays de oligonucleótidos de alta densidad que incluyen entre 40 y 60.000 conjuntos de sondas de oligonucleótidos con secuencias de todo el transcriptoma de la especie estudiada [Irizarry y cols., 2003]. Cada sonda es un conjunto de diferentes oligonucleótidos que corresponden a distintas regiones codificantes del gen que representan. Al mismo tiempo, cada sonda es un oligonucleótido del que hay miles de copias en cada microcelda del microarray, que termina teniendo miles de celdas, una por cada diferente oligonucleótido.

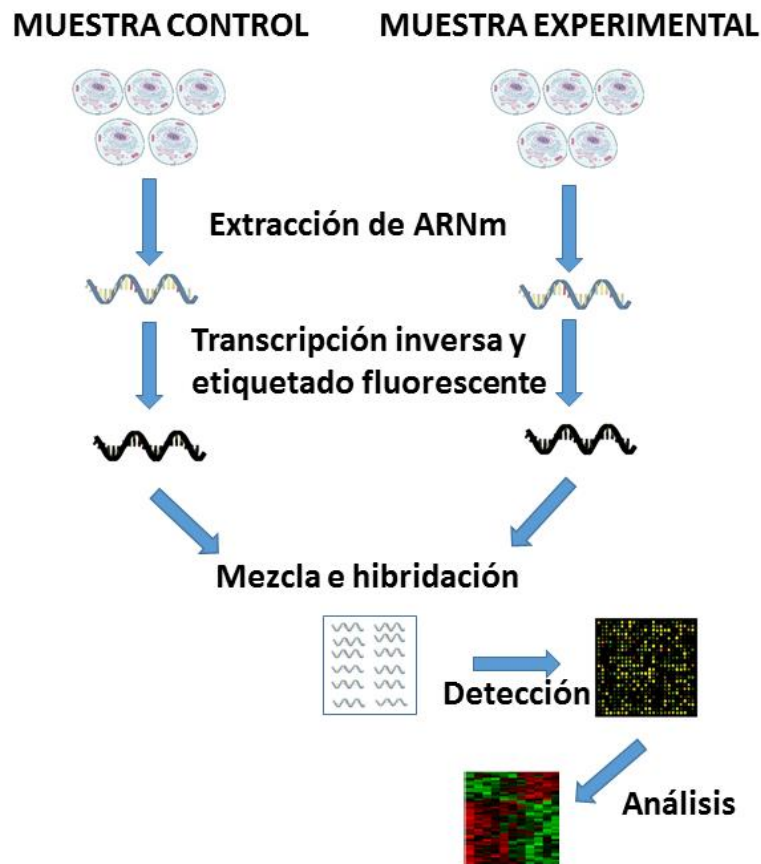


Figura 2. Esquema de técnica de microarray para comparación de dos muestras. Si el objetivo es la comparación de expresión génica, habitualmente se utilizan dos muestras, actuando una de ellas de control, mientras que la otra es el foco del experimento. Tras extraer y purificar ARNm de las muestras de estudio, se realiza la transcripción inversa y etiquetado del ARNm para poder detectar los transcritos por hibridación. La realización de la reacción de transcripción inversa produce ADNc. En el etiquetado, se incorpora una sonda fluorescente unido al ADNc. Cada una de las muestras se marca con una sonda diferente. Cuando no se usan las sondas, se usa amplificación para generar ARNc a partir del ADNc. En el microarray se produce la hibridación de los ADNc con sondas de ADNc sintético. Finalmente, se produce la excitación de las marcas fluorescentes con un láser, lo que produce una señal por parte de las secuencias unidas.

Miles de copias del ARNm total extraído de las muestras analizadas nos sirven para obtener fragmentos de ADN complementario (ADNc) marcados, que se hibridan sobre las sondas del microarray.

La medida obtenida de un único microarray permite cuantificar la expresión de muchos genes al mismo tiempo, cuantificación proporcional a la cantidad de ARNm transcrito de cada gen, es decir, a su nivel de expresión en la muestra analizada.

Para conseguir unos datos finales fiables, es necesario realizar varias réplicas biológicas de cada muestra, algo que supone un aumento importante del número de datos por experimento, por lo que es recomendable que el tratamiento de los datos de expresión obtenidos se aborde computacionalmente, manteniendo siempre criterios con sentido matemático y biológico.

1.7.2. PCR en tiempo real.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica presentada por primera vez en 1985 [Embury y cols., 1987] creada para la copia y síntesis de grandes cantidades de ADN. La técnica se sirve de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN y usa ciclos alternos de altas y bajas temperaturas, provocando la separación de hebras de ADN que se forman en cada proceso de replicación, permitiendo después que se unan de nuevo para repetir el proceso. La síntesis de una nueva hebra de ADN complementaria que realizan las ADN polimerasas, ocurre con la adición de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) complementarios del extremo 5' de la hebra de ADN al extremo 3', uniendo el grupo 5'-fosfato de la hebra que actúa de donador con el grupo 3'-hidroxilo del final de la hebra de ADN aceptora [Saiki y cols., 1988].

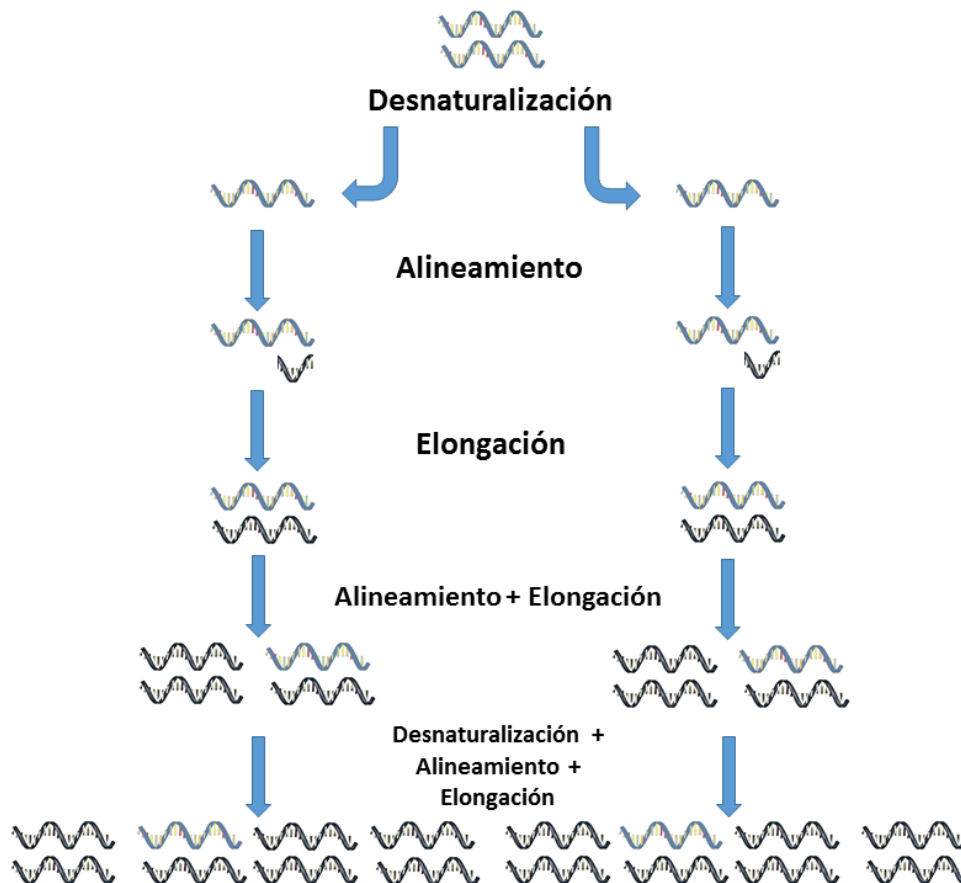


Figura 3. Esquema de la reacción en cadena de la polimerasa.

Por su parte, la PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR, de sus siglas en inglés, *quantitative polymerase chain reaction*) permite cuantificar el número de secuencias de ADN específicas. Esta técnica resuelve el problema de la cuantificación de la técnica de la PCR como tal. Así mismo, frente a la PCR tradicional, la qPCR no requiere procesos posteriores para analizar el resultado, tales como electroforesis y análisis de imagen [Filion, 2012; Niesters, 2001]. Otras ventajas adicionales de la qPCR son la mayor rapidez y que los datos son tomados en la fase exponencial del proceso, asegurando que ningún componente esté limitando el proceso de amplificación.

Para conseguir esta cuantificación, la qPCR incorpora una sonda fluorescente que permite un análisis “en tiempo real”, incorporando un termociclador al que se acopla un fluorímetro. Los dos métodos más comunes de detección utilizados en la qPCR son los específicos y los

inespecíficos. Estos últimos usan sondas fluorescentes (como el fluoróforo SYBR Green I o el LC Green Plus, como alternativa más económica) que pueden intercalarse con cualquier cadena doble de ADN.

1.7.3. Transcriptoma.

En el caso de organismos multicelulares, cada célula de un individuo contiene el mismo genoma, pero no todos los genes están transcripcionalmente activos en cada célula, sino que cada célula presenta diferentes patrones de expresión génica. Estas diferencias representan el amplio rango de variaciones (“fenotípicas”) entre las diferentes células y tejidos.

Un transcriptoma representa ese pequeño porcentaje del genoma (se ha estimado que menos del 5% en humanos) que se transcribe en moléculas de ARN, es decir, es el conjunto de transcritos representados en una célula determinada en un momento determinado y, aun así, captura un nivel de complejidad muy superior al de una secuencia genómica cualquiera [Adams, 2008]. El transcriptoma está compuesto tanto de secuencias de ARN no codificantes como codificantes (proteoma), incluyendo diferentes variantes de ARNm (isoformas por *splicing* alternativo) [Brown, 2002].

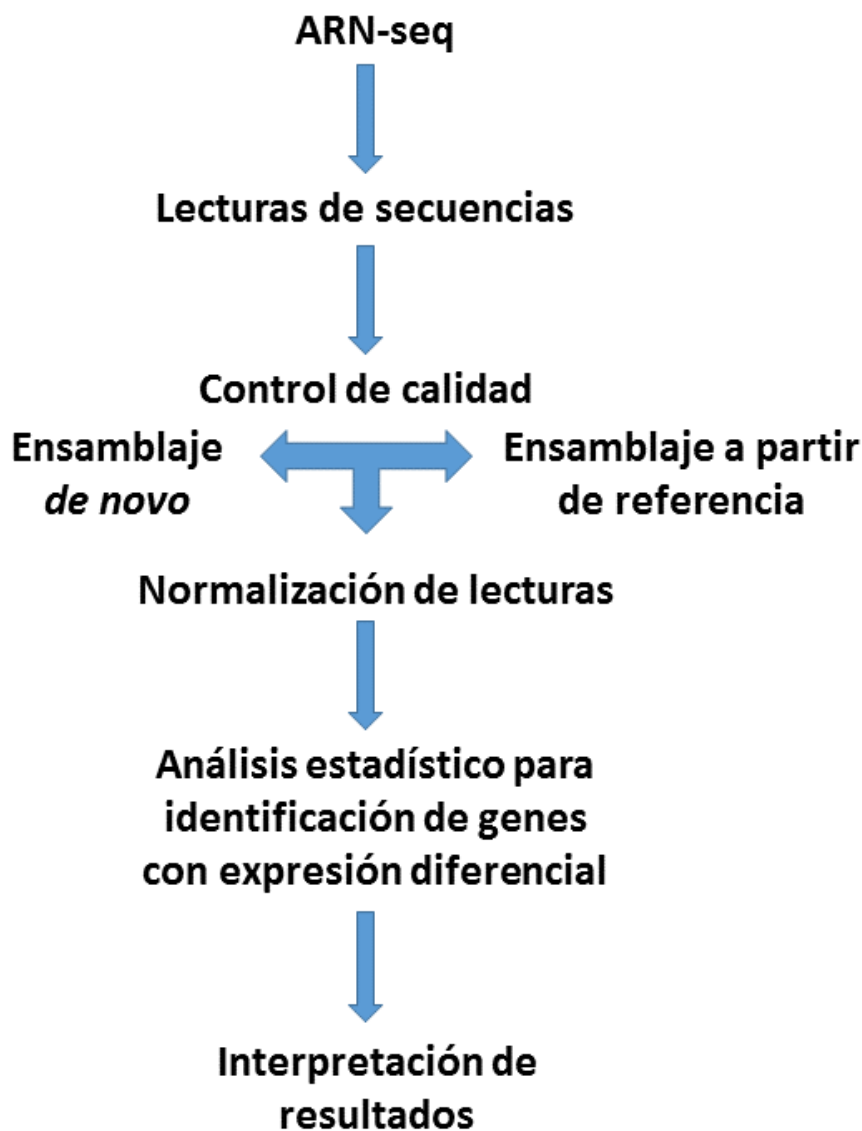


Figura 4. Esquema explicativo sobre la metodología para la obtención del transcriptoma.

Para realizar el análisis de un transcriptoma, actualmente se utilizan fundamentalmente las técnicas de microarrays de expresión, qPCR y RNA-seq (*RNA sequencing*). Las dos primeras ya han sido descritas anteriormente y la RNA-Seq es una técnica que proporciona una cobertura completa de transcritos [Soto y López, 2012], genera información tanto de la secuencia como de la estructura de exones y sitios de *splicing* alternativo, proporcionando datos que tienen una alta precisión con respecto a los niveles de expresión génica que se obtienen a través de la qPCR [Soto y López, 2012].

Como se muestra en la Fig. 5, la técnica RNA-seq consiste en la conversión de ARN a una librería de fragmentos de ADNc con adaptadores ligados en los extremos, que se secuencian y finalmente alinean con el genoma, con transcritos de referencia o ensamblan *de novo* [Zhong y cols., 2009].

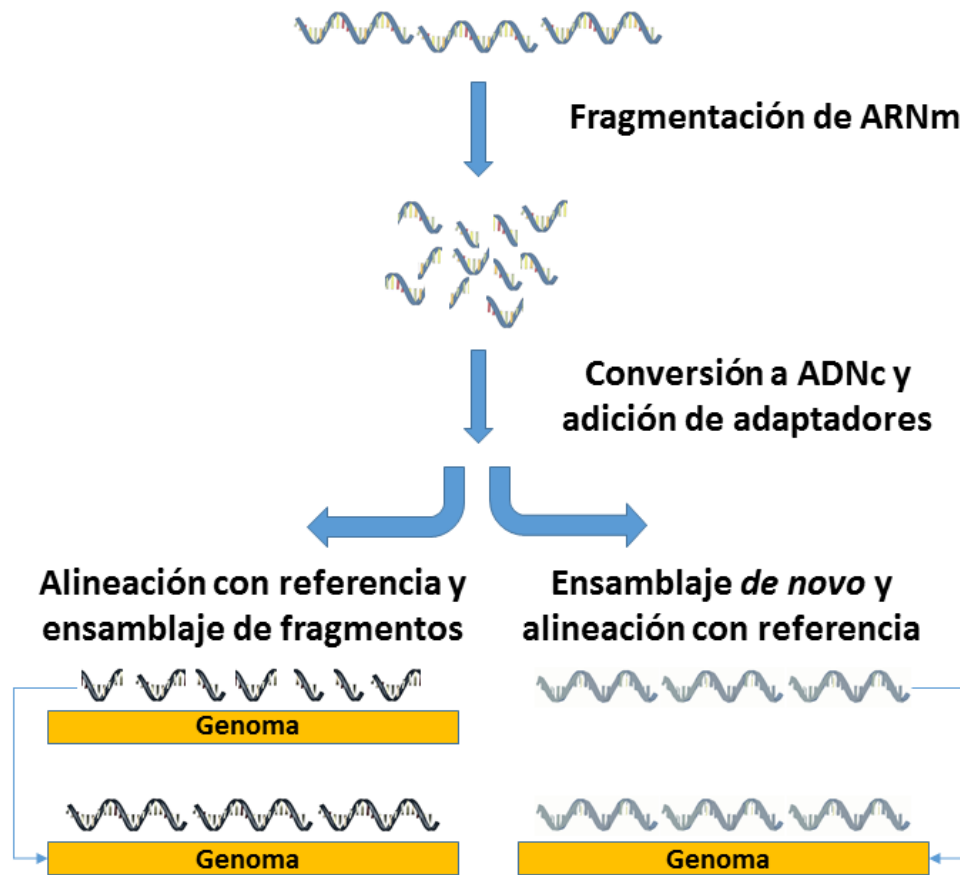
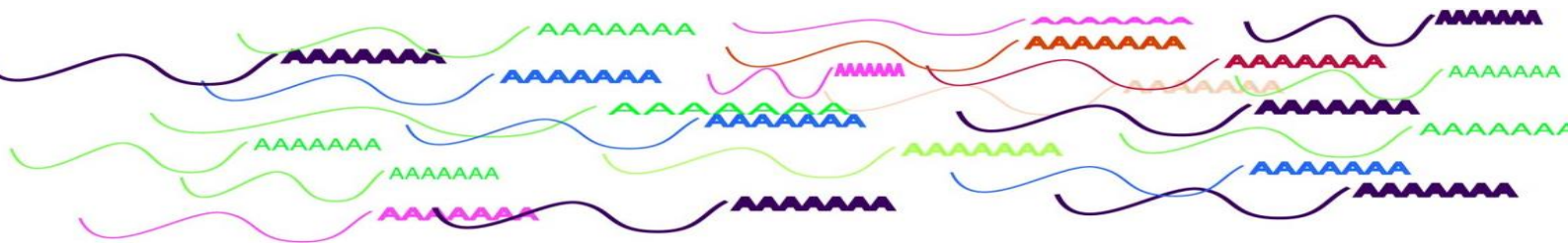


Figura 5. Esquema explicativo de la base de la técnica de RNA-seq.

El estudio de los transcriptomas permite determinar qué genes se expresan cualitativa y cuantitativamente en una muestra de tejido o célula concreta. Pueden usarse para estudiar los perfiles de expresión génica en diferentes etapas del desarrollo de un organismo, de un determinado tejido o grupos de células, tanto patológicos como no, en un momento concreto, o, incluso, para el estudio de secuencias intergénicas, intrónicas o antisentido [Claverie, 2005].



2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis.

Establecido el uso de la cepa GASH:Sal para el estudio de la epilepsia audiogénica, el mayor problema que nos encontramos para identificar las diferencias de expresión génica entre la línea de hámsteres sirios GASH:Sal y los hámsteres control, es la carencia de la descripción del genoma del hámster sirio (*Mesocricetus auratus*). La solución inicial empleada para tal estudio fue el empleo de abordajes indirectos, utilizando como base el conocimiento del genoma completo del ratón (*Mus musculus*), especie con la que existe estrecha distancia filogenética [Romanenko y cols., 2007; Ryu y cols., 2013]. Con la reciente publicación del genoma del hámster chino, *Cricetulus griseus* [Lewis y cols., 2013], más afín al hámster sirio que el ratón, el abordaje indirecto empleado para identificar las diferencias de expresión génica aumenta su fiabilidad.

Es conocido que, tras un estímulo acústico, se desencadenan las crisis convulsivas únicamente en el hámster GASH:Sal y no en el hámster control. Por otra parte, también se conoce que el CI es el núcleo desencadenante de las crisis epilépticas, y, por tanto, la hipótesis de esta tesis doctoral es que deben existir diferencias en los perfiles de expresión génicos, es decir, genes diferencialmente expresados, entre las mencionadas líneas de hámsteres sirios en este núcleo cerebral que explique el desencadenamiento de las convulsiones epilépticas en el GASH:Sal.

Para comprobar tal hipótesis, se analizó el transcriptoma del CI de la línea de hámsteres sirios GASH:Sal, así como el de sus controles y, seguidamente, se compararon entre ellos.

2.2 Objetivos.

Objetivo general: Buscar las diferencias en los perfiles de expresión génica en el núcleo desencadenante de las crisis ictales entre la línea de hámster sirio GASH:Sal y su control, intentando explicar, a éste nivel génico, un sustrato molecular para la epileptogénesis en el modelo de epilepsia GASH:Sal.

Objetivo 1: Identificar el transcriptoma del CI de la línea de hámsteres sirios GASH:Sal, así como el de sus controles.

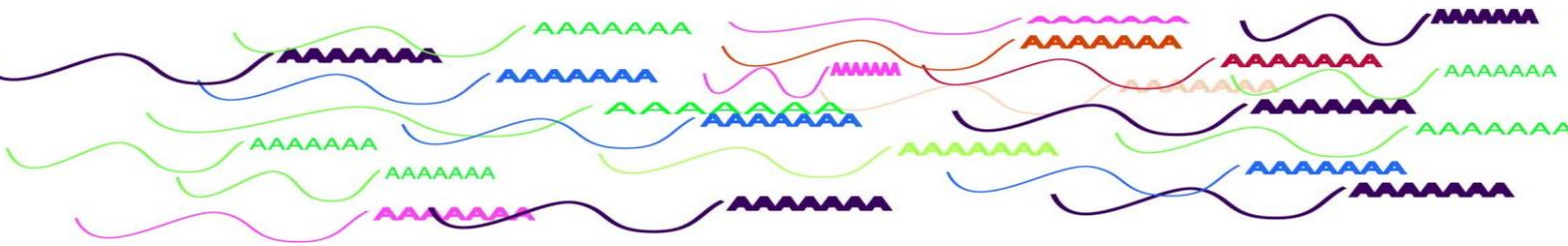
Objetivo 2: Realizar la anotación de los genes del transcriptoma del colículo inferior del GASH:Sal y del hámster sirio control, e incorporar los datos obtenidos a la base de datos *on line* del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

Objetivo 3: Comparar los transcriptomas del CI de la línea de hámsteres sirios GASH:Sal y el de sus controles.

Objetivo 4: Realizar un análisis de los procesos biológicos y rutas metabólicas asociadas a los genes diferencialmente expresados en el transcriptoma del CI de la línea de hámsteres sirios GASH:Sal con relación a sus controles.

Objetivo 5: Validar mediante RT-qPCR los resultados obtenidos en la comparativa de los dos transcriptomas en relación a los niveles de expresión de 5 genes diferencialmente expresados.

Objetivo 6: Comparar la expresión diferencial génica del colículo inferior tras una crisis epiléptica con la de otro modelo de epilepsia audiógena, concretamente el de la rata WAR (*Wistar Audiogenic Rat*).



3. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para realizar la comparación del transcriptoma del CI del GASH:Sal en relación al de su control (objetivo 1), se embeberá el CI en TRIzol®, se extraerá su ARN total y, posteriormente, se sintetizarán los ADNcs correspondientes para la obtención de ambos transcriptomas que serán analizados posteriormente.

El CI empleado será tanto de hámsteres sirios controles como de los de la línea GASH:Sal después de haber sido estimulados con un sonido desencadenante de las crisis epilépticas para detectar los posibles genes causantes o relacionados con esta patología.

Para anotar los genes del transcriptoma del CI de la línea de hámster sirio GASH:Sal (objetivo 2), se utilizará como base genómica el genoma del *Mesocricetus auratus*, presentado en *Genome assembly from the chinese hamster ovary cell line CHO-K1* [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000223135.1/], y el algoritmo BLAST [*Basic Local Alignment Search Tool*: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>].

Para llevar a cabo las clasificaciones funcionales de los genes diferencialmente expresados al comparar los dos transcriptomas (GASH:Sal vs. Control): procesos biológicos, funciones moleculares, componentes celulares, fenotipo asociado a enfermedad y rutas metabólicas asociadas (objetivo 4), se realizarán distintos estudios empleando las bases de datos biológicas disponibles en plataformas web como *The PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships) Classification System*, *STRING 10.0*, *The Comparative Toxicogenomics Database* y *KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) PATHWAY Database*.

Usando la técnica de RT-qPCR, se validarán las expresiones de algunos de los genes diferencialmente expresados en el CI al comparar ambos

transcriptomas (objetivo 5). Además, se aislarán y purificarán ARNs totales del CI de la cepa audiogénica WAR (*Wistar Audiogenic Rat*), tras una crisis epiléptica, que será utilizado en el estudio de los niveles de expresión génica de determinados genes mediante RT-qPCRs, que será comparado con la expresión diferencial génica del CI del otro modelo de epilepsia audiogénica, la de la línea de hámster sirio GASH:Sal (objetivo 6).

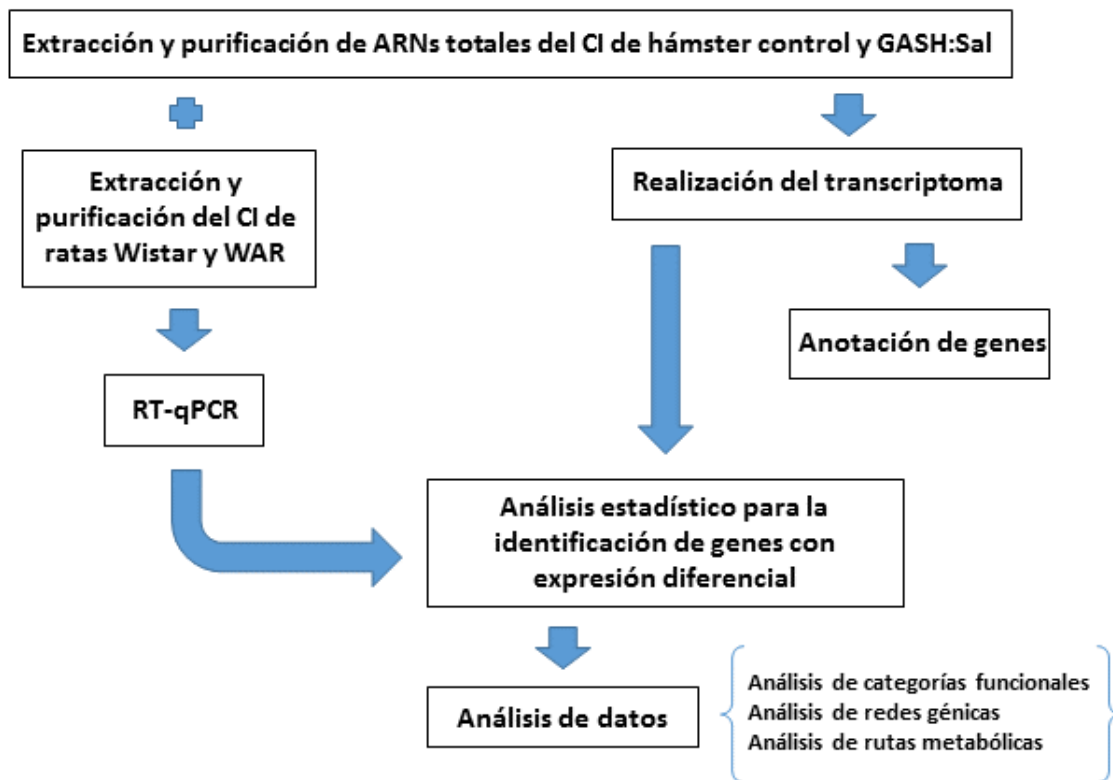
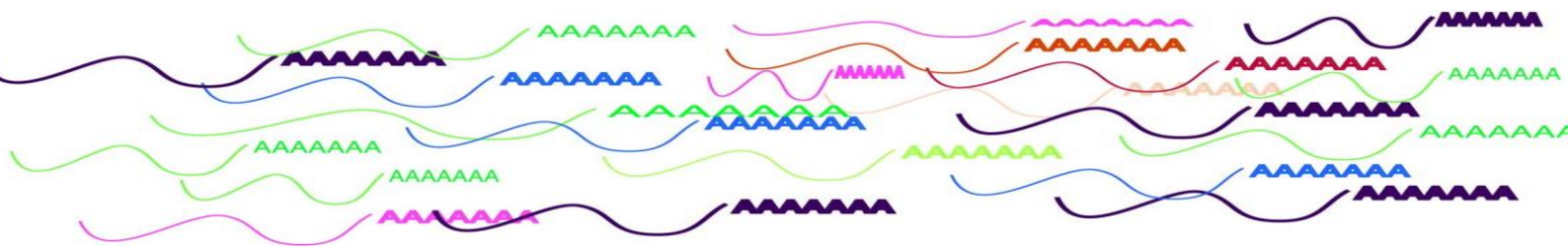


Figura 6. Diseño experimental. Esquema resumen de los pasos seguidos en este estudio para alcanzar los objetivos planteados.



4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Animales de Experimentación. Grupos experimentales.

En los diferentes estudios realizados se emplearon hámsteres sirios controles, *Mesocricetus auratus*, Lak:LVG(SYR)BR procedentes de Charles River, Barcelona, España, y hámsteres de la línea GASH:Sal, obtenidos en el Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Salamanca.

Concretamente:

- Para el estudio del transcriptoma, se emplearon 6 hámsteres sirios control y 6 GASH:Sal, todos ellos sometidos a estimulación sonora.
- Para la validación de los resultados obtenidos en el análisis del transcriptoma mediante estudios de expresión de los genes seleccionados se emplearon 15 hámsteres (8 controles y 7 GASH:Sal).
- Para los análisis comparativos con otro modelo de epilepsia audiogénica, concretamente el de la rata WAR, se emplearon ratas albinas adultas *Rattus norvegicus*, de la línea Wistar (n = 6) (Charles River, Barcelona, España) y ratas de la línea WAR (n = 6) procedentes del bioterio de la Facultad de Medicina de Ribeirão Preto (Universidad de São Paulo, Brasil).

Todos los experimentos con animales fueron realizados cumpliendo la normativa legal europea (Directiva 2010/63/UE) y 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

4.2 Obtención del material biológico.

4.2.1. Extracción de ARN total del CI.

Tras decapitar los animales, y manteniendo siempre el tejido del CI en condiciones cercanas a 0 °C para evitar la degradación del ARN, se embebieron los CI en el reactivo TRIzol® (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, EE.UU.).

Para la extracción de RNA total como tal se empleó una modificación del método de [Chomczynski y Sacchi, 1987], utilizando el reactivo TRIzol®, siguiendo el protocolo recomendado por los fabricantes. Se utilizó 1 ml de TRIzol® por cada 100 mg de tejido, y se procedió a la homogeneización del mismo mediante el *Polytron (T10 basic Ultra-Turrax*, Ika, Alemania). Tras incubar el preparado durante 5 minutos 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 minutos 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 minutos 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 minutos 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 ARNasas, incubando a 60 °C durante 10 minutos, para favorecer la disolución del precipitado.

4.2.2 Tratamiento de ARN total con ADNasa I, purificación y cuantificación del ARN.

Los RNA obtenidos de las muestras fueron tratados con *ADNasa I* (Roche, Madrid-España) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Aproximadamente 10-15 µg de ARN en 20,5 µl de ARN total, se trata con

1µl de ADNasa I 10 U/µl (10×10^3 unidades) y 2,5µl de buffer de ADNasa 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 minutos. La ADNasa 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 minutos a 75 °C. Así mismo, para eliminar la posible contaminación de ADN 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 del ARN se determinó por espectrofotometría con un equipo NanoDrop (NanoDrop 2000C espectrofotómetro, *Thermo Scientific*) (Fig. 7). Este instrumento realiza la cuantificación del ARN 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 y cols., 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 ARN.

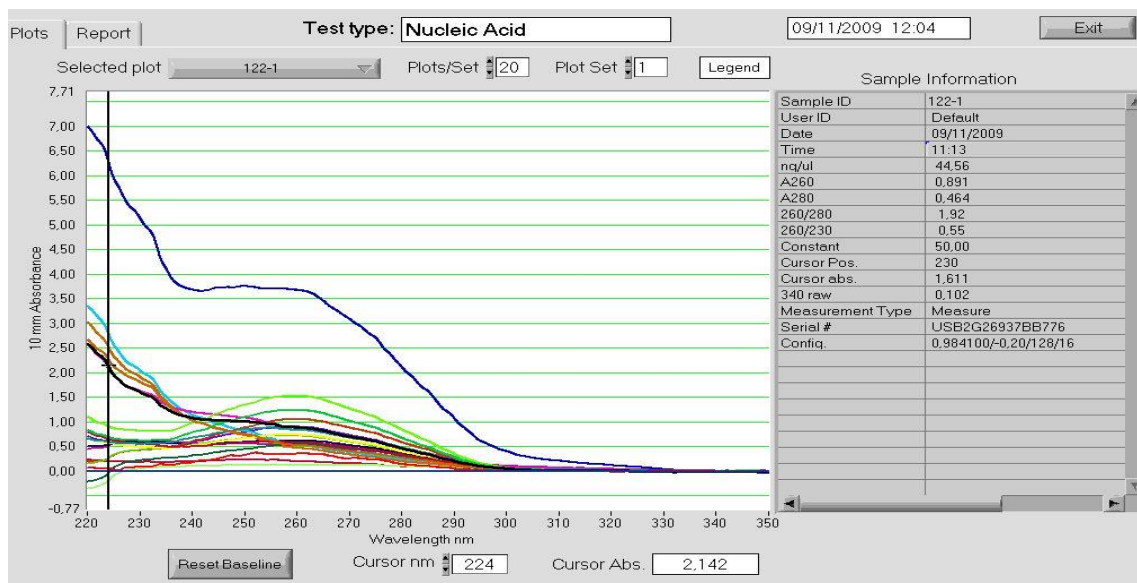


Figura 7. Análisis espectrográfico de una muestra de RNA en el *NanoDrop*. En el eje Y se representa la absorbancia y, en el eje X, la longitud de onda en nanómetros.

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

4.3 Transcriptómica.

Una vez obtenido los ARNs totales de los CIs de los hámsteres sirios control y los de la línea GASH:Sal y, comprobada su integridad, se procedió a la realización de cada uno de los transcriptomas.

4.3.1 Generación de librerías RNA-seq.

Para la generación de las librerías correspondientes al hámster control y al GASH:Sal se utilizó una mezcla de ARNs de varios CI (6 de GASH:Sal y 6

del control) de cada tipo (1 µg de cada muestra). Específicamente, las dos librerías se prepararon con 3 µg de ARN total cada una de ellas utilizando el *Truseq RNA Sample prep kit v2* (Illumina), añadiendo dos procesos de captura consecutivos de ARN poly(A) para eliminar el ARNr [Illumina, 2014].

4.3.2 Secuenciación.

La secuenciación de las dos librerías se realizó en un Genome Analyzer IIx (Illumina) en el formato *single read* (1x75).



Figura 8. Illumina Genome Analyzer IIx.

Las secuencias obtenidas fueron demultiplexadas (procesa las lecturas y las segrega y copia en directorios individuales junto con un índice de los mismos) mediante el uso del programa CASAVA [http://support.illumina.com/sequencing/sequencing_software/casava.html] y se eliminaron aquéllas que no pasaban los criterios de pureza determinados de forma primaria por el programa del secuenciador, que examina la pureza de la señal en los primeros 25 ciclos de funcionamiento.

Los valores de calidad se asociaron con valores superiores a 30 en la escala PHRED, que determina la probabilidad de que la base sea leída de manera errónea, y posee un valor máximo de 40, que indica la máxima confianza en la identificación de la base, y un mínimo de 0 [Ewing y cols., 1998].

Como resultado final de la secuenciación, se obtuvieron 25.066.143 y 27.848.979 lecturas, considerando una longitud media de 76 pares de bases, para el transcriptoma del hámster sirio control y la línea GASH:Sal, respectivamente.

4.3.3 Análisis de datos del transcriptoma.

Los datos de secuencias obtenidos se analizaron a tres distintos niveles:

Primario: Control de calidad del dato bruto.

Secundario: Mapeo y cuantificación de transcritos.

Terciario: Análisis de expresión.

4.3.3.1 Análisis primario. Control de calidad del dato bruto.

Para la selección de la mejor estrategia de pre-procesamiento de las lecturas iniciales se realizó un *metadata*, en el que se ajustaron los parámetros de calidad seleccionados por el equipo de *Cenit Support Systems*, con la finalidad de obtener las lecturas de máxima calidad. Para ello, en las ocasiones en que fuera necesario, se eliminaron nucleótidos externos. Concretamente, se seleccionó un “*trimmer*” de 15 nucleótidos en la región 3' de las lecturas, es decir, que en 15 ocasiones se prescindió de nucleótidos del extremo 3' debido a que esa zona carecía de la “calidad” del resto de la secuencia. La evaluación de los parámetros de calidad del dato bruto fue realizada con el programa *FastQC* [<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>].

4.3.3.2 Análisis secundario. Mapeo y cuantificación de transcritos.

Las secuencias/lecturas se mapearon frente a la última versión del genoma del hámster chino proporcionado por la base de datos NCBI

(*National Center for Biotechnology Information*) y con código NW_003613580. Posteriormente se eliminaron las lecturas de baja calidad en el mapeo mediante *Picard Tools* [<http://broadinstitute.github.io/picard/>] y las secuencias con valores altos de “calidad” se utilizaron para el ensamblaje, identificación y cuantificación de los transcritos mediante inferencia bayesiana [*Cufflinks* v2.02, <http://cole-trapnell-lab.github.io/cufflinks/>]. El algoritmo de mapeo, al igual que la estrategia de pre-procesamiento, se seleccionó mediante meta-análisis, optándose por el algoritmo que mejor se ajustará a la muestra de estudio mediante una serie de parámetros de calidad. En este caso, se seleccionó el algoritmo propuesto por *Top-Hat* [Kim y cols., 2013]. En este punto, también se ajustaron los parámetros técnicos para llevar a cabo la anotación funcional.

4.3.3.3 Análisis terciario. Análisis de expresión.

Para el análisis de expresión de las muestras, una vez tenemos nuestras secuencias filtradas y limpias de contaminantes, se realiza un mapeo de los datos de partida o *raw data* frente al ensamblaje y después una estimación de la abundancia del número de secuencias que alinean en cada transcrito o unigen. Para la realización de tales estudios, se utilizó el paquete *HTSeq* [Anders y cols., 2014] para obtener el número de secuencias que alinean en cada transcrito o unigen, término que está asociado a la expresión génica. Posteriormente, para identificar los transcritos expresados diferencialmente se usó el paquete de herramientas *DESeq* [Anders y Huber, 2012] de la plataforma Bioconductor [<http://www.bioconductor.org/>]. En el presente estudio se seleccionaron dos tipos de estudios de expresión diferencial, el “estricto”, en que se tomó como umbral de una probabilidad p menor o igual a 0,05; y, debido a la no utilización de réplicas biológicas, un estudio adicional “no estricto”, considerando un valor de p sin ajustar a 0,05. Para la obtención del fichero VCF (*Variant Call Format*) que contiene las variantes de la secuencia y su información, fue necesario previamente la eliminación las lecturas duplicadas, tras lo que se ejecutó el programa

VarScan [Koboldt y cols., 2009]. Por otra parte, para la selección de variantes específicas se utilizaron las herramientas *vcf-tools* [Danecek y cols., 2011].

Después de anteriores procesos, se produjo la identificación de los genes diferencialmente expresados. Dicha identificación, se calculó a partir de las muestras de elección para poder realizar comparaciones entre las mismas. Teniendo en cuenta este hecho, se establecieron análisis distintos para el cálculo de la expresión diferencial y se realizaron para cada uno de los grupos de muestras establecidas, generando datos dos a dos de la comparación de las muestras de interés (Figs. 9 y 10).

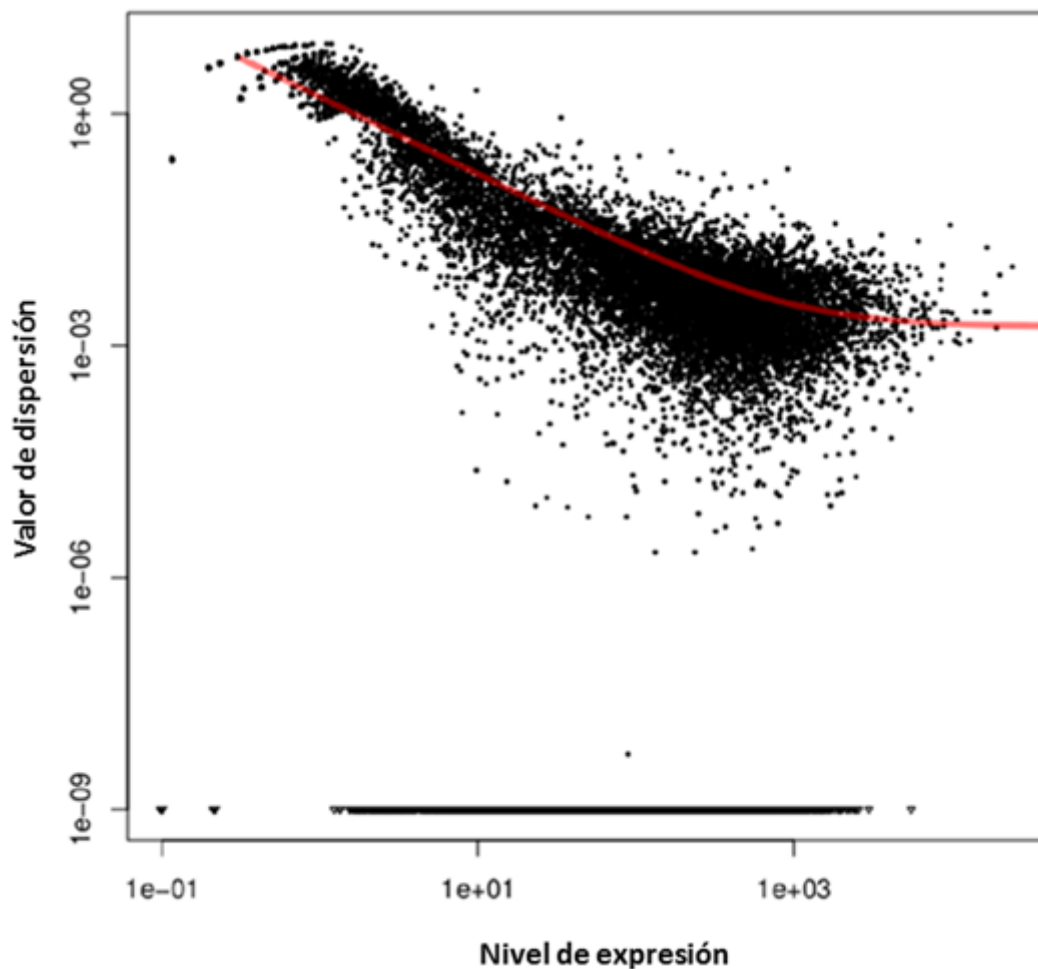


Figura 9. Ajuste del modelo teórico (línea roja) con los valores experimentales (puntos negros). En el eje Y se representa el valor de dispersión y, en el eje X, el nivel de expresión.

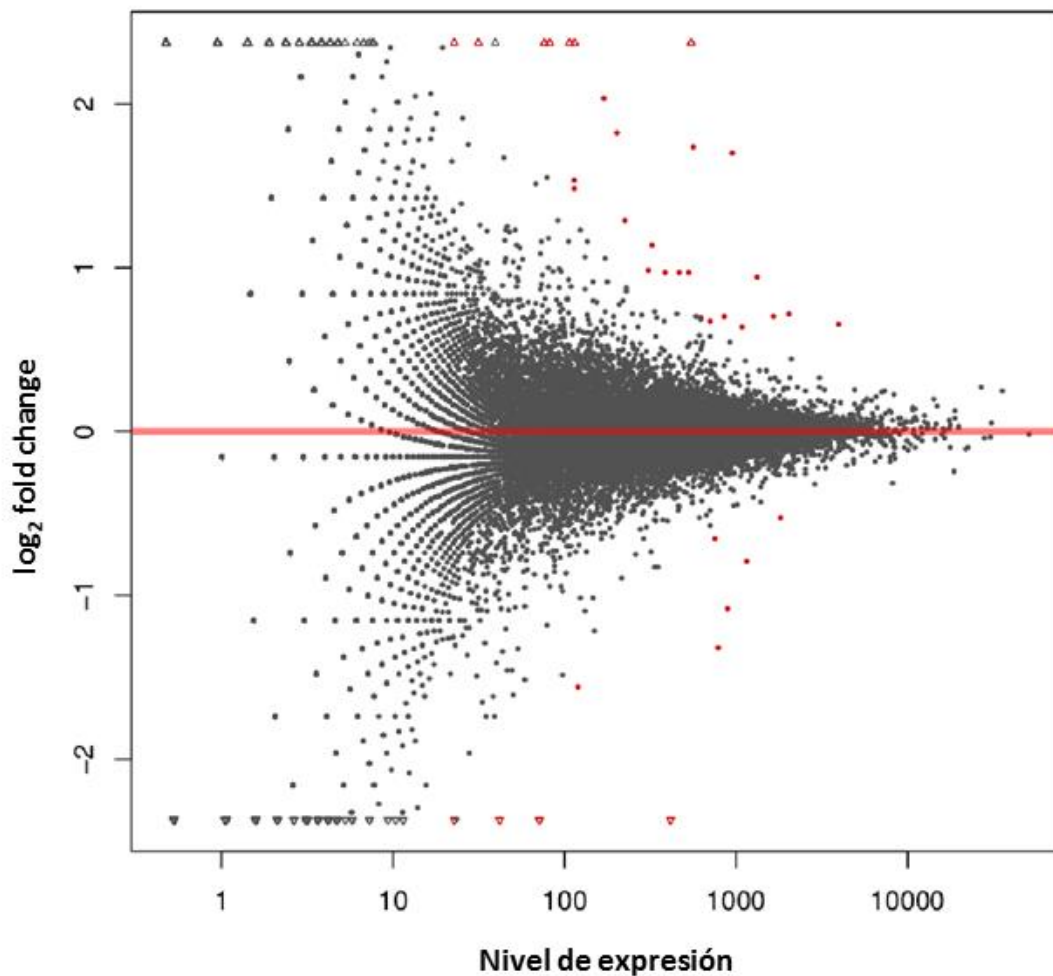


Figura 10. Gráfico que muestra el nivel de expresión medio de los diferentes genes del transcriptoma. Los genes diferencialmente expresados se muestran en color rojo. En el eje Y se representa el FC y, en el eje X, el nivel de expresión.

Tras estas comprobaciones, se recopilaron los genes alterados diferencialmente entre GASH:Sal y el control, con toda la información de la expresión diferencial y su anotación funcional en relación a todos los genes a estudio para los análisis posteriores.

4.3.3.4 Estudio de enriquecimiento funcional.

Se utilizó el test hiper-geométrico presente en el paquete base de R para obtener el valor de p asociado, usando un valor de p ajustado a 0,05 por *False Discovery Rate* (FDR) [Benjamini y Hochberg, 1995] para determinar una categoría funcional como estadísticamente sobre-representada.

4.4 Anotación de los datos del transcriptoma.

Todos los transcritos detectados mediante inferencia bayesiana fueron anotados utilizando el algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), proporcionado por el NCBI de los EE.UU. BLAST actúa buscando regiones de similitud entre secuencias: compara nucleótidos o proteínas con secuencias en las bases de datos disponibles y calcula la significancia estadística de las coincidencias [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>].

Con esta anotación se obtienen los nombres de genes que corresponden a cada una de las lecturas/secuencias obtenidas, un buen punto de partida para posteriores análisis.

4.5 Correlaciones génicas y funcionales de los genes diferenciales del transcriptoma.

Después del control de calidad de los genes diferencialmente expresados, normalización de las librerías y comprobación de la ausencia de desviación estadística entre la expresión diferencial y la expresión media, se empezó el análisis de los datos obtenidos como tal.

Uno de los medios de análisis más interesantes es el trabajo con la tabla de los datos obtenida (un ejemplo sería la tabla que se puede encontrar en el Anexo 1), donde se pueden observar individualmente los niveles de expresión génica 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*).

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 diferencialmente expresados. Concretamente, las bases de datos utilizadas fueron:

- *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.

4.6 Validación de genes diferencialmente expresados en el análisis del transcriptoma mediante RT-qPCR.

Para validar los resultados obtenidos en el estudio de los transcriptomas se utilizaron otra técnica de análisis de expresión génica más sensible como la RT-qPCR. Esta presenta dos etapas diferenciadas, una primera denominada retrotranscripción (RT) o transcripción reversa, consistente en la síntesis de ADNc a partir de ARNm, y una segunda etapa que utiliza como molde de ADN el propio ADNc sintetizado anteriormente, que es la propia qPCR.

En primer lugar, para obtener ADNc por retrotranscripción de ARNm, 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 minutos, 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 tri-fosfato) 0,5 mM, 20 U del inhibidor de ribonucleasas *Recombinant RNasin®* y agua ultrapura libre de ARNasas hasta un volumen final de 15 µl. La reacción se somete durante 5 minutos a 25 °C, lo que permite que el cebador anille con el ARN molde; posteriormente, se incuba a 42 °C durante 1 hora, para que la transcriptasa sintetice el ADNc. Finalmente, la transcriptasa inversa se inactiva incubando 15 minutos 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 ADN (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 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 (Fig. 11) [Schmittgen y Livak, 2008].

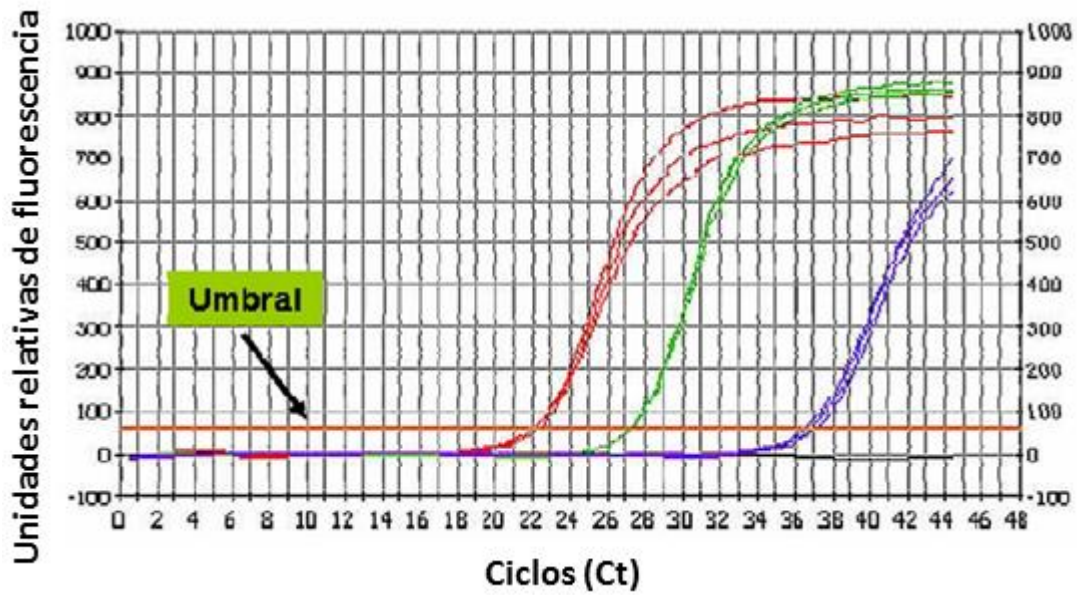


Figura 11. Gráfico que representa los valores logarítmicos de fluorescencia frente al número de ciclos, valores inversamente proporcionales a la cantidad de ADNc inicial.

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 ADNc de cualquiera de las muestras a estudio y se calcularon los Ct obtenidos para cada una de las concentraciones dispuestas (Fig. 12).

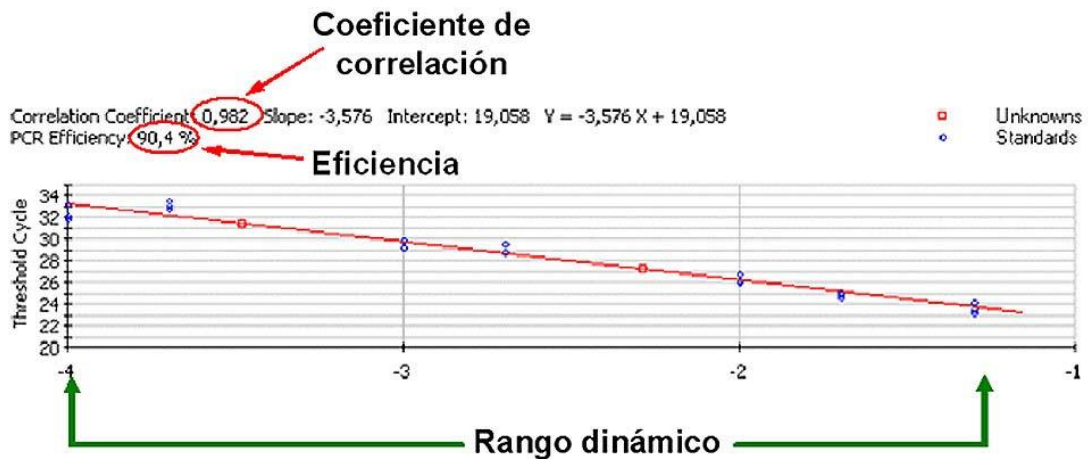


Figura 12. Representación gráfica del cálculo de los Ct (ciclo umbral) obtenidos para cada una de las concentraciones dispuestas, con valores de coeficiente de correlación, eficiencia y rango dinámico.

Seguidamente, la qPCR como tal fue realizada usando la sonda inespecífica SYBR-Green I, fluorocromo que se une a la doble hebra de ADN. 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. Como se observa en la Fig. 13, la curva de desnaturalización se obtiene al aumentar grado a grado (ejemplo: de 60 °C a los 95 °C) hasta que se observa que en un determinado grado centígrado se desnaturaliza nuestro producto de PCR específico (Fig. 13)

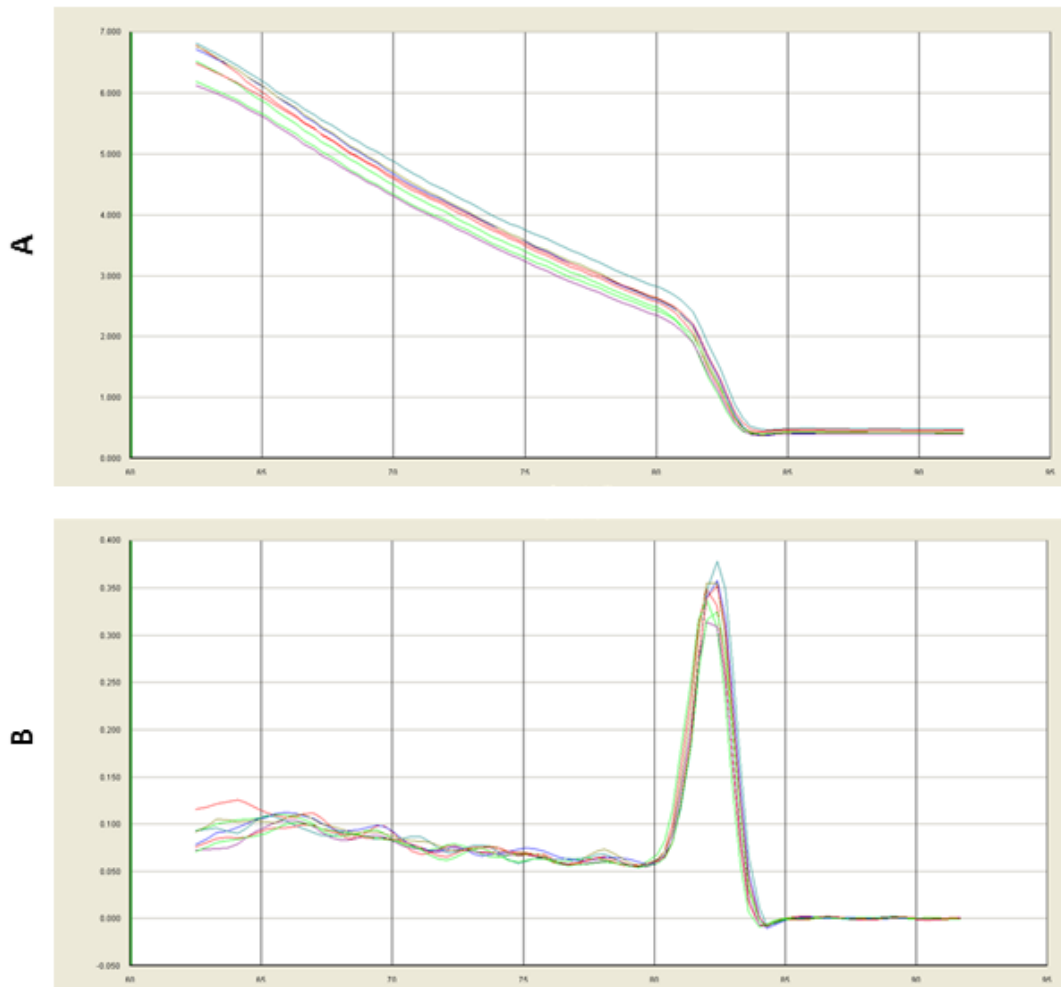


Figura 13. Curva de desnaturalización de un grupo de muestras. (A) El eje de ordenadas marca la fluorescencia frente al eje de abscisas, la temperatura. (B) Se muestra un único pico, producto del *amplicon* de PCR específico generado. El eje de ordenadas representa la derivada de la fluorescencia respecto a la temperatura frente al eje de abscisas, la temperatura.

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 ADNc 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 minutos 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; así mismo, 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 a 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 y cols., 2004] calculamos las variaciones de expresión génica intra e intergrupar, concluyendo que el gen de la *β -act* es el más estable. Como gen de referencia o control endógeno, se empleó el gen de la β -actina (Tabla 1).

4.6.1 Análisis Estadísticos.

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa *PASW Statistics 18.0.0* (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.). La descripción de los datos se efectuó mediante media \pm error estándar de la media (SEM, de sus siglas en inglés) tanto para variables continuas como para frecuencias absolutas y relativas de variables categóricas. Los resultados de los parámetros estudiados en las diferentes condiciones experimentales se

compararon entre los diferentes grupos haciendo uso del módulo ANOVA y, en los casos apropiados, se realizaron comparaciones múltiples post-hoc y el test *t de Student* para variables independientes. Los resultados se consideraron significativos cuando $p \leq 0,05$.

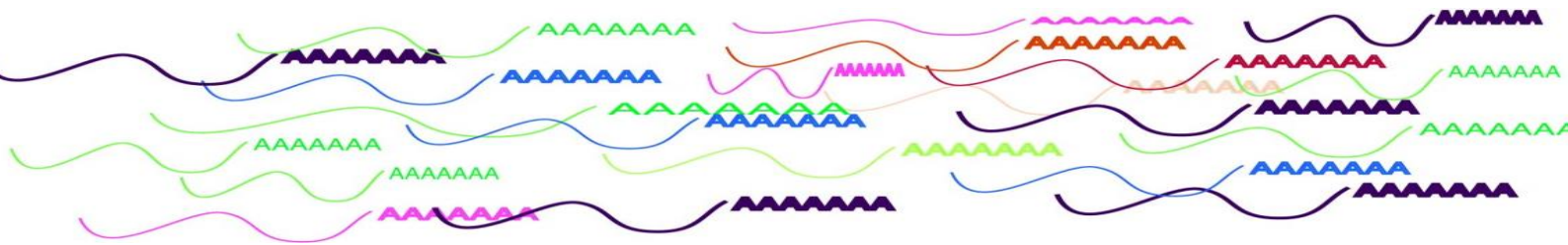
| Proteína objetivo | Número GenBank ¹ | Cebador Directo | ADNc Directo | Cebador Inverso | ADNc Inverso ¹ | Tamaño del producto | E ² |
|----------------------------------|--|------------------------------|--|--------------------------|--|---------------------|----------------|
| <i>Egr1</i> | NM_012551.2 <i>Rattus norvegicus</i> XM_005065288.1 <i>Mesocricetus auratus</i> XM_007636101.1 <i>Cricetulus griseus</i> | CAGC(A/G)GCGC(T/C)TTCAATCCTC | 162–181 502–521 265–284 | GTGGTCAGGTGCT CGTAGGG | 202–221 542–561 305–324 | 60 | 2.04 |
| <i>Egr2</i> | XM_003515916.1 <i>Cricetulus griseus</i> XM_005070807.1 <i>Mesocricetus auratus</i> AB264614.1 <i>Rattus norvegicus</i> | AGGCCCTTGGATCT CCCATA | 31–50 347–363 559–575 27–46 | CAGCTGGCACCAG GGTACTG | 127–146 443–462 655–674 123–142 | 116 | 2.00 |
| <i>Egr3</i> | XM_006252240.1 <i>Rattus norvegicus</i> XM_006252239.1 <i>Rattus norvegicus</i> XM_005071015.1 <i>Mesocricetus auratus</i> XM_005071014.1 <i>Mesocricetus auratus</i> XM_005071013.1 <i>Mesocricetus auratus</i> XM_003496195.1 <i>Cricetulus griseus</i> | CCACAAGCCCTTCC AGTGTC | 1198–1217 1019–1038 789–808 955–975 1154–1173 780–799 | GTGCGGATGTGAG TGGTGAG | 1253–1273 1074–1094 844–860 1010–1026 1209–1225 835–855 | 75 | 1.98 |
| <i>Gabra4</i> | XM_008770135.1 <i>Rattus norvegicus</i> XM_003507783.2 <i>Rattus norvegicus</i> XM_007634147.1 <i>Rattus norvegicus</i> XM_007634149.1 <i>Rattus norvegicus</i> XM_007634150.1 <i>Cricetulus griseus</i> XM_005080795.1 <i>Mesocricetus auratus</i> XM_005080796.1 <i>Mesocricetus auratus</i> XM_005080797.1 <i>Mesocricetus auratus</i> | CACCAT(A/C)AGTGC GGAGTGTC | 1276–1295 498–517 498–517 441–460 441–460 605–624 441–460 441–460 | ATTTCAAAGGGCA GGCATGA | 1327–1346 549–568 549–568 492–511 492–511 656–675 492–511 492–511 | 71 | 1.98 |
| <i>Gapdh</i> | NM_017008.4 <i>Rattus norvegicus</i> NM_001244854.2 <i>Cricetulus griseus</i> | ACATGCCGCTGGA GAAACCT | 805–824 802–821 | GCCCAGGATGCC TTTAGTGG | 874–894 871–891 | 90 | 2.00 |
| <i>β-actina</i> | XM_006248886.1 <i>Rattus norvegicus</i> XM_006248885.1 <i>Rattus norvegicus</i> XM_007648665.1 <i>Cricetulus griseus</i> NM_001281595.1 <i>Mesocricetus auratus</i> | AGCCATGTACGTAG CCATCC | 240–259 415–434 489–506 390–407 | ACCCTCATAGATGG GCACAG | 335–354 510–529 584–602 485–503 | 115 | 2.03 |

Tabla 1. Cebadores utilizados en la qPCR.

¹Se indica la localización del cebador correspondiente a las secuencias origen del *GenBank* (obtenido del NCBI) para rata y la especie de hámster correspondiente.

²La eficiencia del cebador de la qPCR (E) se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación: $E=10^{(-1/\text{pendiente})}$.

Referencias: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s. = no significativo.



5. RESULTADOS

5.1 Envío de las secuencias de los transcriptomas del CI del hámster sirio Control y del de la línea GASH:Sal a bases de datos online.

Las secuencias correspondientes a los transcriptomas del CI tras estimulación acústica, tanto del hámster sirio control como de la línea de hámster sirio GASH:Sal, se pusieron a disposición de la comunidad científica a través de la base de datos del NCBI.






| Title | App | Group | Status |
|---|------------|-------|---|
| Mesocricetus auratus Transcriptome or Gene expression | BioProject | |  BioProject: Processed PRJNA230618 : Study of Mesocricetus auratus' Inferior Colliculus Transcriptome after acustic stimulation (TaxId: 10036) |
| BioProject: 230618 TSA | TSA | |  TSA: Processing GBHS00000000 gashsubmission.sqn |
| BioProject: 230618 TSA | TSA | |  TSA: Processing GBHR00000000 controlsubmission.sqn |
| Model organism or animal sample | BioSample | |  BioSample: Processed Successfully loaded (8 objects) |
| Model organism or animal sample | BioSample | |  BioSample: Processed Successfully loaded (7 objects) |

Figura 14. Detalle del portal de envíos del NCBI [<https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/subs/>] en el que se observan las entradas correspondientes a “proyecto”, “muestra” y “experimento”.

Siguiendo las instrucciones de la plataforma del NCBI, en primer lugar, se creó una entrada del “proyecto” (*BioProject submission*, [<https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/subs/bioproject/>]) con el título *Study of Mesocricetus auratus' Inferior Colliculus Transcriptome after acustic stimulation* [López-López y cols., 2014]. A continuación, se crearon dentro del mismo, las entradas correspondientes a las “muestras” y a las del propio “experimento” como tal, incluyendo características de las muestras y detallando los procesos que llevaron a la obtención de los resultados obtenidos de ambos transcriptomas (*BioSample submission*, [<https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/subs/biosample/>]); SRA, *Sequence Read Archive, submission*, [<https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/subs/sra/>]).

Los archivos con la información de ambos transcriptomas se enviaron en formato *Sequin* (.sqn). Para ello, los archivos iniciales que se encontraban en formato *FASTA* (.fsa) fueron convertidos al formato *Sequin* utilizando el

programa de la plataforma *on line Tbl2asn* [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/tbl2asn2/>], proporcionado por el NCBI (TSA, *Transcriptome Shotgun Assembly, submission*) [<https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/subs/tsa/>]. Seguidamente, para finalizar el proceso anterior al envío definitivo de los archivos, en los casos en que fue necesaria una serie de ajustes y/o correcciones en la secuencia resultante en formato Sequin, se utilizó el programa bioinformático *GenBeans* [<http://www.genbeans.org/>] para realizarlos.

5.2 Análisis de la expresión diferencial del transcriptoma del CI de la línea de hámster sirio GASH:Sal en comparación con el del hámster control.

Tras la correspondiente estimulación sonora que genera las crisis convulsivas epilépticas, se obtuvieron y analizaron los transcriptomas del CI de la línea de hámster sirio GASH:Sal y del control utilizando como base de la anotación génica el genoma del hámster chino y, a continuación, se procedió al análisis de la posible expresión diferencial del transcriptoma de la línea de hámster sirio GASH:Sal en comparación con la del control.

Se detectaron un total de 102.277 genes en los transcriptomas del CI de la línea de hámster sirio GASH:Sal y del hámster control, de los que se pudieron identificar 86.695, mientras que 84.141 proporcionaron valores de expresión en uno o ambos transcriptomas (82.034 en el caso de la línea de hámster sirio GASH:Sal y 83.580 en el del control).

Seguidamente, se realizó un filtro entre los genes identificados con mayor expresión diferencial al comparar los transcriptomas del CI de la línea de hámster sirio GASH:Sal respecto a la del hámster control, estableciendo un umbral de corte de $FC \geq 2,0$, obteniendo una muestra de 61.093 genes. Finalmente, se optó por realizar un análisis “estricto” para que los resultados fueran estadísticamente significativos ($p \leq 0,05$). De este modo, sólo los genes cuya lectura de expresión diferencial tuvieran asociado un $p \leq 0,05$ y un $FC \geq 2$, formaron parte de la muestra final, constituida por 58

genes expresados diferencialmente (Figs. 16 y 17; Tabla 2 y Anexo 1). Sobre éstos 58 genes, se realizaron análisis posteriores con el objetivo de caracterizarlos individualmente y como conjunto.

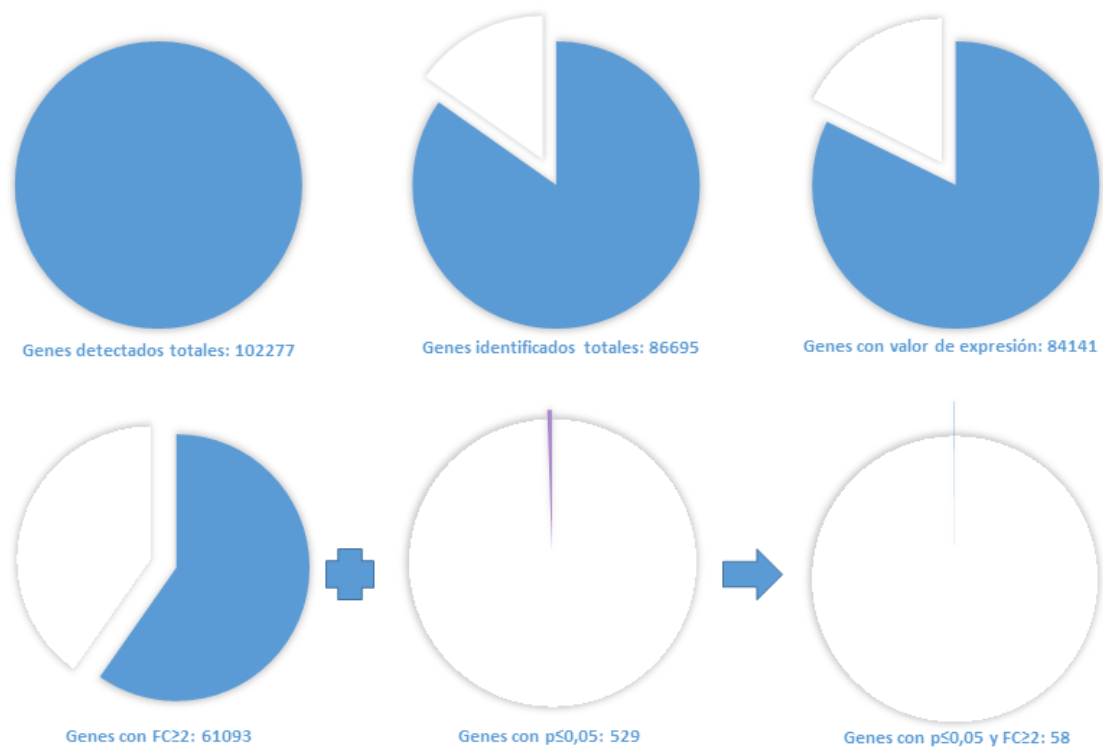


Figura 15. Diagrama de la variación del tamaño de la muestra de estudio según diferentes parámetros: existencia de identificación, de valor de expresión, valor de expresión diferencial según FC, p asociado al valor de expresión diferencial y estos dos últimos simultáneamente.

Como se mencionó en el apartado de *Material y Métodos*, para la realización de las clasificaciones funcionales se utilizó la base de datos *PANTHER*; para el análisis en profundidad de las rutas metabólicas en las que participaban los genes del estudio, se utilizó la base de datos *KEGG*; mientras que, para el análisis de las relaciones entre las proteínas codificadas por los genes de la muestra, se usó la base de datos de interacciones STRING 10.0.

Tanto *PANTHER* como *STRING* carecen aún en sus bases de datos del genoma de hámster chino, por lo que se hicieron los análisis usando los datos del genoma de ratón como referencia para los análisis, debido a que se

trata de una especie con la que existe estrecha distancia filogenética [Romanenko y cols., 2007; Ryu y cols., 2013].

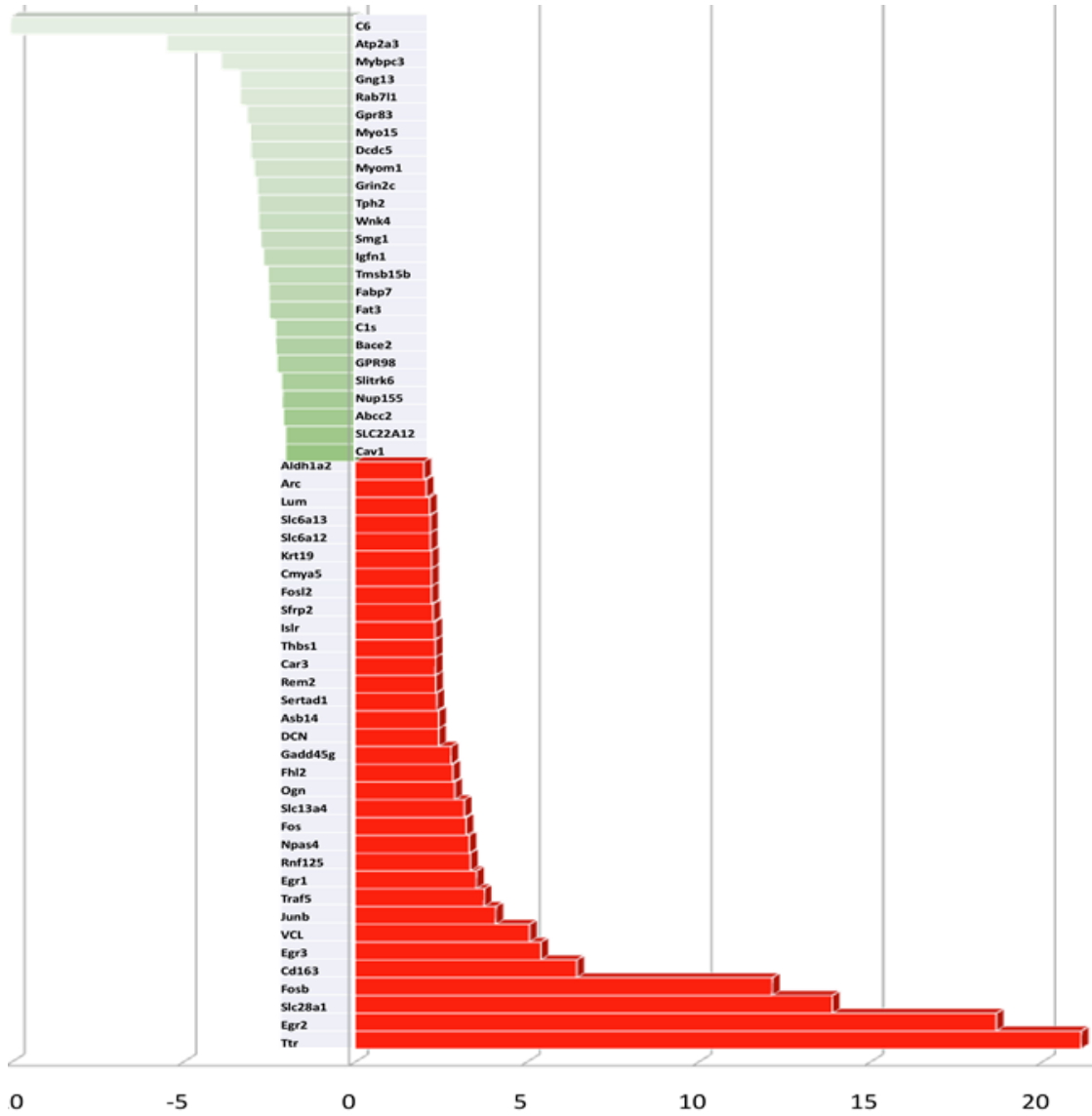


Figura 16. Listado de genes (58) diferencialmente expresados e identificados con $p \leq 0.05$ y $FC > 2$, del transcriptoma del CI de la línea de hámster sirio GASH:Sal en comparación al del hámster sirio control, y ordenados según el valor de su FC, de menor a mayor. En la mitad superior se encuentran los genes del GASH:Sal infra-expresados (verde) y en la inferior los sobre-expresados (rojo).

| Símbolo del gen | Nombre del gen |
|-----------------|---|
| <i>Abcc2</i> | ATP binding cassette subfamily C member 2 |
| <i>Aldh1a2</i> | Aldehyde dehydrogenase 1 family member A2 |
| <i>Arc</i> | Activity-regulated cytoskeleton-associated protein |
| <i>Asb14</i> | Ankyrin repeat and SOCS box containing 14 |
| <i>Atp2a3</i> | Atpase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ transporting 3 |
| <i>Bace2</i> | Beta-site APP-cleaving enzyme 2 |
| <i>C1s</i> | Complement component 1, s subcomponent |
| <i>C6</i> | Complement component 6 |
| <i>Car3</i> | Carbonic anhydrase 3 |
| <i>Cav1</i> | Caveolin 1 |
| <i>Cd163</i> | CD163 antigen |
| <i>Cmya5</i> | Cardiomyopathy associated 5 |
| <i>Dcdc5</i> | Doublecortin domain-containing protein 5 |
| <i>Dcn</i> | Decorin |
| <i>Egr1</i> | Early growth response 1 |
| <i>Egr2</i> | Early growth response 2 |
| <i>Egr3</i> | Early growth response 3 |
| <i>Fabp7</i> | Fatty acid binding protein 7 |
| <i>Fat3</i> | FAT atypical cadherin 3 |
| <i>Fhl2</i> | Four and a half LIM domains 2 |
| <i>Fos</i> | Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit |
| <i>Fosb</i> | FosB proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit |
| <i>Fosl2</i> | FOS like 2, AP-1 transcription factor subunit |
| <i>Gadd45g</i> | Growth arrest and ADN-damage-inducible 45 gamma |
| <i>Gng13</i> | Guanine nucleotide binding protein subunit gamma 13 |
| <i>Gpr83</i> | G protein-coupled receptor 83 |
| <i>Gpr98</i> | Adgrv1: Adhesion G protein-coupled receptor V1 |
| <i>Grin2c</i> | Glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2C |
| <i>Igfn1</i> | Immunoglobulin-like and fibronectin type III domain containing 1 |
| <i>Islr</i> | Immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat |
| <i>Junb</i> | Proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit |
| <i>Krt19</i> | Keratin, type I cytoskeletal 19 |
| <i>Lum</i> | Lumican |
| <i>Mybpc3</i> | Myosin binding protein C, cardiac |
| <i>Myo15</i> | Myosin XVA |
| <i>Myom1</i> | Myomesin 1 |
| <i>Npas4</i> | Neuronal PAS domain protein 4 |
| <i>Nup155</i> | Nucleoporin 155kda |
| <i>Ogn</i> | Osteoglycin |
| <i>Rab29</i> | Member RAS oncogene family |
| <i>Rem2</i> | RRAD and GEM like gtpase 2 |
| <i>Rnf125</i> | Ring finger protein 125, E3 ubiquitin protein ligase |
| <i>Sertad1</i> | SERTA domain containing 1 |
| <i>Sfrp2</i> | Secreted frizzled related protein 2 |
| <i>Slc13a4</i> | Solute carrier family 13 (sodium/sulfate symporter), member 4 |
| <i>Slc22a12</i> | Solute carrier family 22 (organic anion/cation transporter), member 12 |
| <i>Slc28a1</i> | Solute carrier family 28 (concentrative nucleoside transporter), member 1 |
| <i>Slc6a12</i> | Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 12 |

| Símbolo del gen | Nombre del gen |
|-----------------|---|
| <i>Slc6a13</i> | Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, GABA), member 13 |
| <i>Slitrk6</i> | SLIT and NTRK like family member 6 |
| <i>Smg1</i> | SMG1, nonsense mediated ARNm decay associated PI3K related kinase |
| <i>Thbs1</i> | Thrombospondin-1 |
| <i>Tmsb15b</i> | Thymosin beta 15B |
| <i>Tph2</i> | Tryptophan 5-hydroxylase 2 |
| <i>Traf5</i> | TNF receptor associated factor 5 |
| <i>Ttr</i> | Transthyretin |
| <i>Vcl</i> | Vinculin |
| <i>Wnk4</i> | WNK lysine deficient protein kinase 4 |

Tabla 2. Lista de los nombres de los 58 genes diferencialmente expresados e identificados con $FC \geq 2,0$ y $p \leq 0,05$ del transcriptoma del CI de la línea de hámster sirio GASH:Sal en comparación al del hámster sirio control según la base de datos genética del NCBI para el hámster chino actualizada el 1 de junio de 2016.

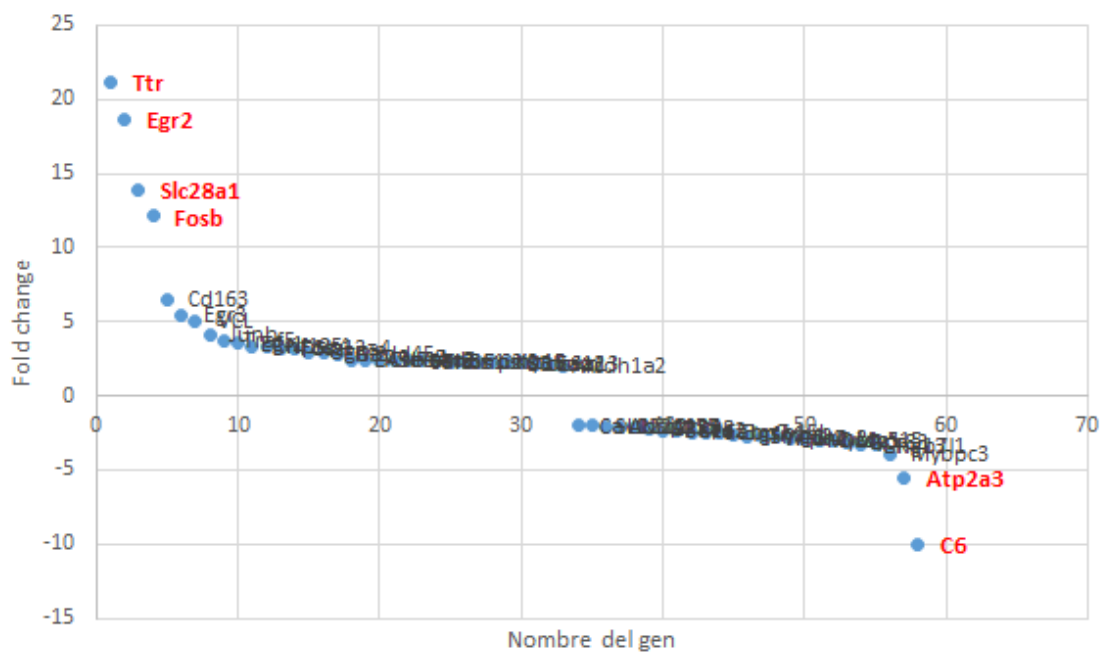


Figura 17. Gráfico de dispersión en el que se observa el FC de los genes diferencialmente expresados e identificados con $FC \geq 2,0$ y $p \leq 0,05$ del transcriptoma del CI de la línea de hámster sirio GASH:Sal en comparación al del hámster sirio control. Se destacan en rojo los genes cuyo valor absoluto de FC aparece claramente distanciado gráficamente de la mayoría de la muestra, agrupada alrededor de la media de los valores absolutos (3,95), concretamente *Ttr* (21,14), *Egr2* (18,67), *Slc28a1* (13,90), *FosB* (12,15), *Atp2a3* (-5,49) y *C6* (-10,03).

5.3 Clasificaciones funcionales y correlaciones de los genes diferencialmente expresados en la línea de hámster sirio GASH:Sal en comparación con la de los hámsteres control.

El análisis de clasificación funcional de los genes diferencialmente expresados comparando los dos transcriptomas del CI, se realizó usando la versión 11.0 de PANTHER, que incluye en el análisis estadístico de la varianza (ANOVA) de comparaciones múltiples de Bonferroni [Ranstam, 2016]. En el caso del análisis de rutas metabólicas, debido a que existen rutas asociadas a varios genes y genes que participan en varias rutas, se realizaron test independientes entre sí con un ajuste de Bonferroni conservador.

Los 58 genes diferencialmente expresados seleccionados para el análisis fueron mapeados por PANTHER y encuadrados en las siguientes categorías: “*funciones moleculares*”, “*componentes celulares*”, “*procesos biológicos*”, “*tipo de proteína*” y “*rutas metabólicas*” (Figs. 18-21 y Tablas 3-8).

De los 58 genes diferencialmente expresados, PANTHER no pudo mapear 2 de ellos: *Dcdc5* y *Tmsb15b*, debido a que no se encuentran aún en su base de datos. La ausencia de algunos genes en las clasificaciones funcionales es debida a que no poseen información asociada dentro de la base de datos de PANTHER en el campo pertinente a cada clasificación.

5.3.1 Funciones moleculares.

La clasificación de las proteínas codificadas por los genes diferencialmente expresados en relación con las funciones moleculares de las mismas, permite apreciar que las *proteínas de unión, catalizadores y transportadores*, son las más representadas en la muestra, con un 29% en los dos primeros casos y un 20% en el tercero.

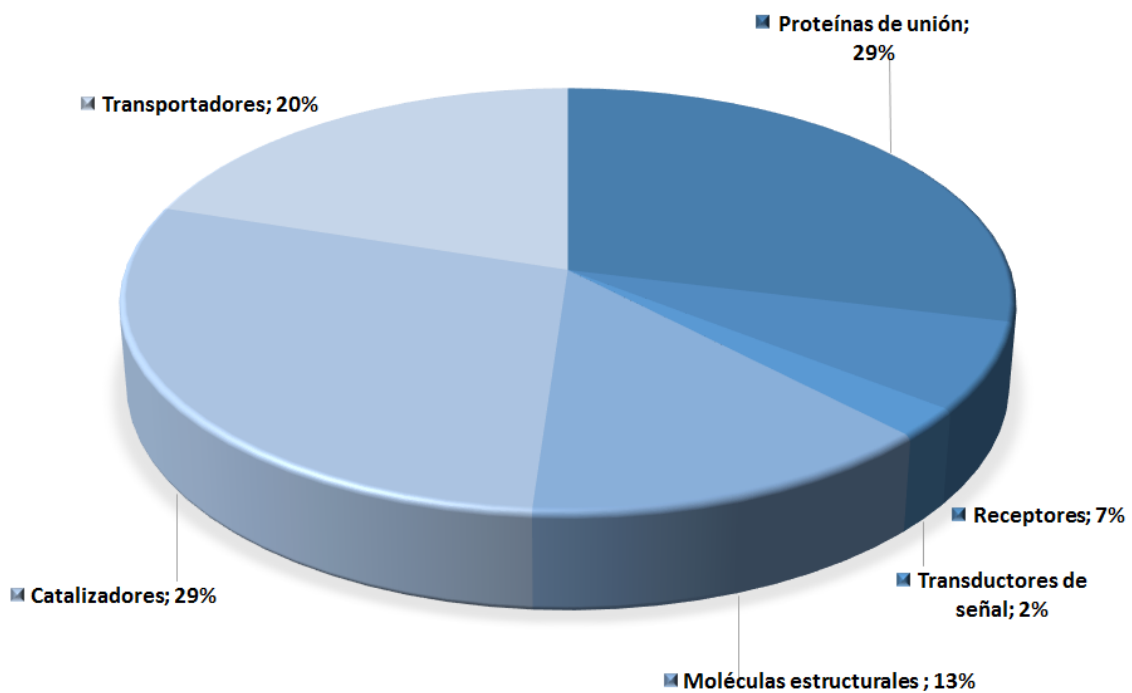


Figura 18. Distribución porcentual de las diferentes categorías funcionales de las proteínas codificadas por los genes diferencialmente expresados del anexo I.

| Proteínas de unión | Catalizadores | Transportadores | Moléculas estructurales | Receptores | Transductores de señal |
|--------------------|----------------|-----------------|-------------------------|--------------|------------------------|
| <i>Bace2</i> | <i>Abcc2</i> | <i>Abcc2</i> | <i>Cav1</i> | <i>Cd163</i> | <i>Sfrp2</i> |
| <i>Cav1</i> | <i>Aldh1a2</i> | <i>Atp2a3</i> | <i>Krt19</i> | <i>Islr</i> | |
| <i>Fhl2</i> | <i>Atp2a3</i> | <i>Gpr98</i> | <i>Mybpc3</i> | <i>Sfrp2</i> | |
| <i>Junb</i> | <i>Bace2</i> | <i>Slc13a4</i> | <i>Myo15</i> | | |
| <i>Lum</i> | <i>C1s</i> | <i>Slc22a12</i> | <i>Myom1</i> | | |
| <i>Mybpc3</i> | <i>Car3</i> | <i>Slc28a1</i> | <i>Nup155</i> | | |
| <i>Myo15</i> | <i>Cav1</i> | <i>Slc6a12</i> | | | |
| <i>Myom1</i> | <i>Cd163</i> | <i>Slc6a13</i> | | | |
| <i>Npas4</i> | <i>DCN</i> | <i>Ttr</i> | | | |
| <i>Rem2</i> | <i>Myo15</i> | | | | |
| <i>Sertad1</i> | <i>Rem2</i> | | | | |
| <i>Sfrp2</i> | <i>Smg1</i> | | | | |
| <i>Traf5</i> | <i>Wnk4</i> | | | | |

Tabla 3. Lista de genes incluidos en las categorías de funciones moleculares. Los genes en rojo aparecen con mayor frecuencia a lo largo de las categorías.

5.3.2 Componentes celulares.

La clasificación funcional del grupo de genes diferencialmente expresados al comparar ambos transcriptomas en relación con los diferentes componentes celulares muestra tres categorías especialmente destacadas, *componentes celulares*, *componentes de membrana* y *orgánulos* (Fig. 19 y Tabla 4).

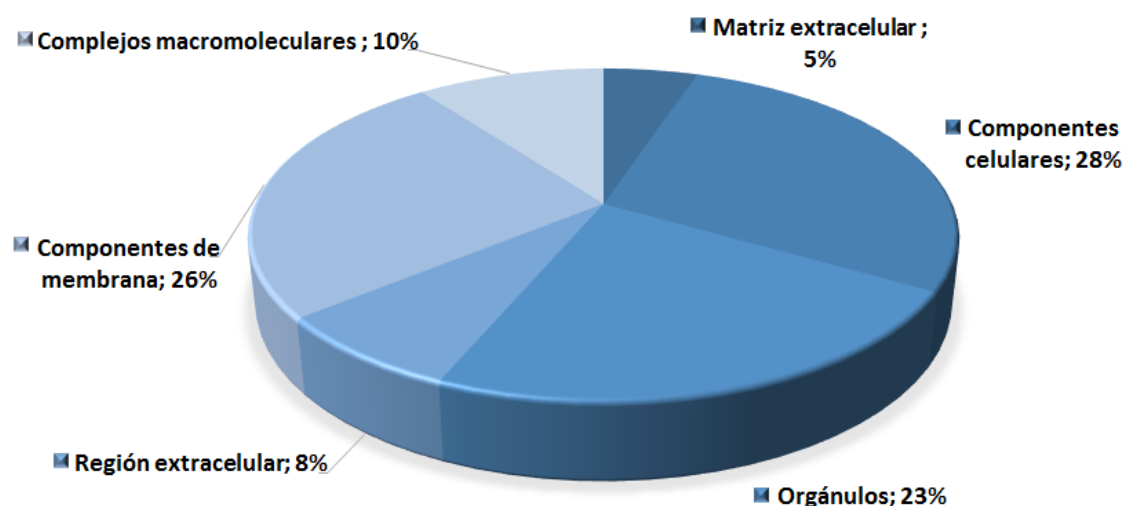


Figura 19. Distribución porcentual de las diferentes categorías subcelulares de las proteínas codificadas por los genes diferencialmente expresados del anexo I.

| Componentes celulares | Matriz extracelular | Región extracelular | Complejos macromoleculares | Componentes de membrana | Orgánulos |
|-----------------------|---------------------|---------------------|----------------------------|-------------------------|---------------|
| <i>Atp2a3</i> | <i>Lum</i> | <i>Islr</i> | <i>Junb</i> | <i>Atp2a3</i> | <i>Atp2a3</i> |
| <i>Bace2</i> | <i>Ogn</i> | <i>Lum</i> | <i>Mybpc3</i> | <i>Myo15</i> | <i>Bace2</i> |
| <i>Dcn</i> | | <i>Ogn</i> | <i>Myom1</i> | <i>Nup155</i> | <i>Junb</i> |
| <i>Junb</i> | | | <i>Nup155</i> | <i>Sfrp2</i> | <i>Krt19</i> |
| <i>Krt19</i> | | | | <i>Slc13a4</i> | <i>Mybpc3</i> |
| <i>Mybpc3</i> | | | | <i>Slc22a12</i> | <i>Myo15</i> |
| <i>Myo15</i> | | | | <i>Slc28a1</i> | <i>Myom1</i> |
| <i>Myom1</i> | | | | <i>Slc6a12</i> | <i>Nup155</i> |
| <i>Nup155</i> | | | | <i>Slc6a13</i> | <i>Rab29</i> |
| <i>Rab29</i> | | | | <i>Slitrk6</i> | |
| <i>Smg1</i> | | | | | |

Tabla 4. Lista de genes incluidos en las categorías de componentes celulares. Los genes en rojo aparecen más frecuentemente que ningún otro a lo largo de las categorías.

Por otra parte, PANTHER permite concretar algunas subcategorías, algo que puede ser interesante dentro de la categoría de *componentes celulares*, por su amplitud, lo que permite observar que todas las proteínas de la

categoría están asociadas con el *citoplasma* intracelular.

5.3.3 Procesos biológicos.

En el caso de la clasificación funcional en relación con los diferentes procesos biológicos, se observa un mayor número de categorías correspondientes a diferentes funciones biológicas asociadas a los genes del estudio, al mismo tiempo que se puede observar una categoría con un elevado número de genes asociados, *procesos celulares* (Fig. 20, Tabla 5).

Estudiando las subcategorías que forman, por ejemplo, la amplia categoría de *procesos celulares*, con 29 entradas, se observa que la que tiene un mayor número de genes asociados es la de *comunicación celular*, seguida de la del *ciclo celular*.

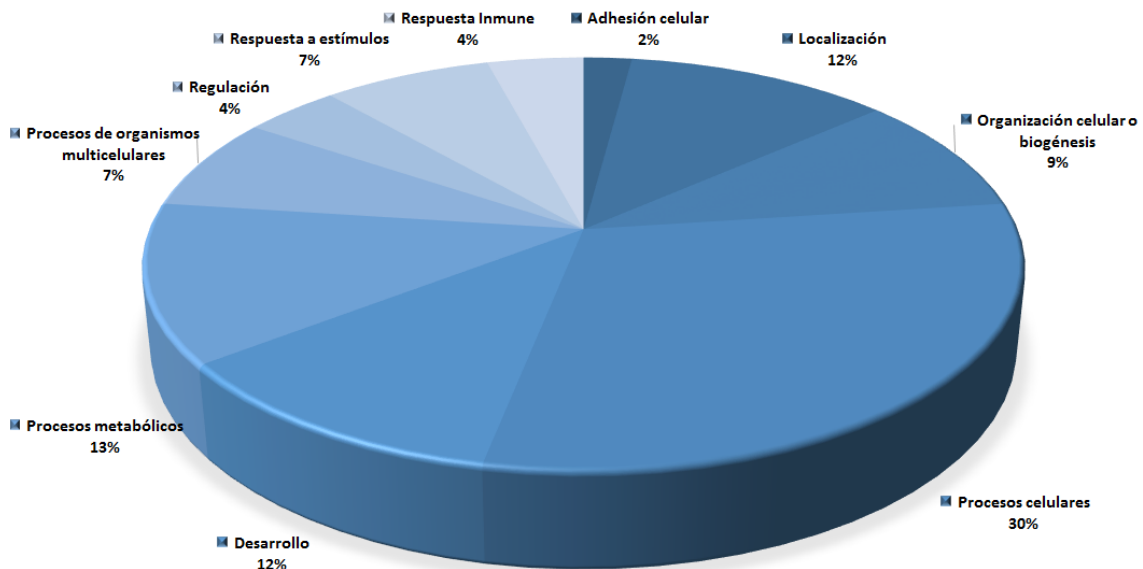


Figura 20. Distribución porcentual de los diferentes procesos biológicos en los que participan las proteínas codificadas por los genes diferencialmente expresados del anexo I.

| Localización | Respuesta a estímulos | Desarrollo | Organización celular o biogénesis | Procesos metabólicos | Procesos celulares |
|-------------------|-------------------------|-------------------------|---|----------------------|--------------------|
| <i>Abcc2</i> | <i>Abcc2</i> | <i>Fabp7</i> | <i>Krt19</i> | <i>Atp2a3</i> | <i>Atp2a3</i> |
| <i>Cav1</i> | <i>C6</i> | <i>Fat3</i> | <i>Lum</i> | <i>Bace2</i> | <i>Bace2</i> |
| <i>Cd163</i> | <i>Dcn</i> | <i>Fhl2</i> | <i>Mybpc3</i> | <i>C1s</i> | <i>C6</i> |
| <i>Myo15</i> | <i>Gadd45g</i> | <i>Gadd45g</i> | <i>Myo15</i> | <i>Cav1</i> | <i>Cav1</i> |
| <i>Nup155</i> | <i>Junb</i> | <i>Junb</i> | <i>Myom1</i> | <i>Cd163</i> | <i>Cd163</i> |
| <i>Rab29</i> | <i>Sfrp2</i> | <i>Lum</i> | <i>Nup155</i> | <i>Dcn</i> | <i>Dcn</i> |
| <i>Rem2</i> | <i>Smg1</i> | <i>Mybpc3</i> | <i>Ogn</i> | <i>Junb</i> | <i>Gadd45g</i> |
| <i>Slc13a4</i> | | <i>Myom1</i> | <i>Rab29</i> | <i>Lum</i> | <i>Gpr98</i> |
| <i>Slc22a12</i> | | <i>Ogn</i> | <i>Slitrk6</i> | <i>Npas4</i> | <i>Islr</i> |
| <i>Slc28a1</i> | | <i>Slitrk6</i> | | <i>Ogn</i> | <i>Junb</i> |
| <i>Ttr</i> | | <i>Traf5</i> | | <i>Rnf125</i> | <i>Krt19</i> |
| | | | | <i>Smg1</i> | <i>Lum</i> |
| | | | | | <i>Mybpc3</i> |
| Regulación | Adhesión celular | Respuesta inmune | Procesos de orgs. multicelulares | | <i>Myo15</i> |
| <i>Atp2a3</i> | <i>C6</i> | <i>C1s</i> | <i>Lum</i> | | <i>Myom1</i> |
| <i>Junb</i> | <i>Rem2</i> | <i>C6</i> | <i>Mybpc3</i> | | <i>Npas4</i> |
| <i>Rnf125</i> | | <i>Gadd45g</i> | <i>Myom1</i> | | <i>Nup155</i> |
| <i>Sfrp2</i> | | <i>Traf5</i> | <i>Ogn</i> | | <i>Ogn</i> |
| | | | <i>Rem2</i> | | <i>Rab29</i> |
| | | | <i>Slitrk6</i> | | <i>Rem2</i> |
| | | | <i>Wnk4</i> | | <i>Rnf125</i> |
| | | | | | <i>Sertad1</i> |
| | | | | | <i>Slc13a</i> |
| | | | | | <i>Slc22a12</i> |
| | | | | | <i>Slc28a1</i> |
| | | | | | <i>Slitrk6</i> |
| | | | | | <i>Smg1</i> |
| | | | | | <i>Traf5</i> |
| | | | | | <i>Wnk4</i> |

Tabla 5. Lista de genes incluidos en las categorías de procesos biológicos. Los genes en rojo aparecen más frecuentemente que ningún otro a lo largo de las categorías.

Lum y *Ogn* resultan los genes más ubicuos en la clasificación. Se observa, al igual que en el apartado anterior (Tabla 4), que ambos aparecen siempre en las mismas categorías, lo que sugiere que están relacionados de algún modo.

5.3.4 Tipos de proteínas.

En el caso de la clasificación funcional en relación con los diferentes tipos de proteínas codificadas por los 58 genes diferencialmente expresados al comparar los dos transcriptomas de esta tesis doctoral, se detecta que las categorías con más genes representados son las de **transportadores** (17%) y **receptores** (12%) (Fig. 21, Tabla 6). En el primer caso, la mayor parte de las entradas se presentan en la subcategoría de **transportadores de cationes** y de **canales iónicos** y, en el segundo, en la de **receptores acoplados a proteínas G**.

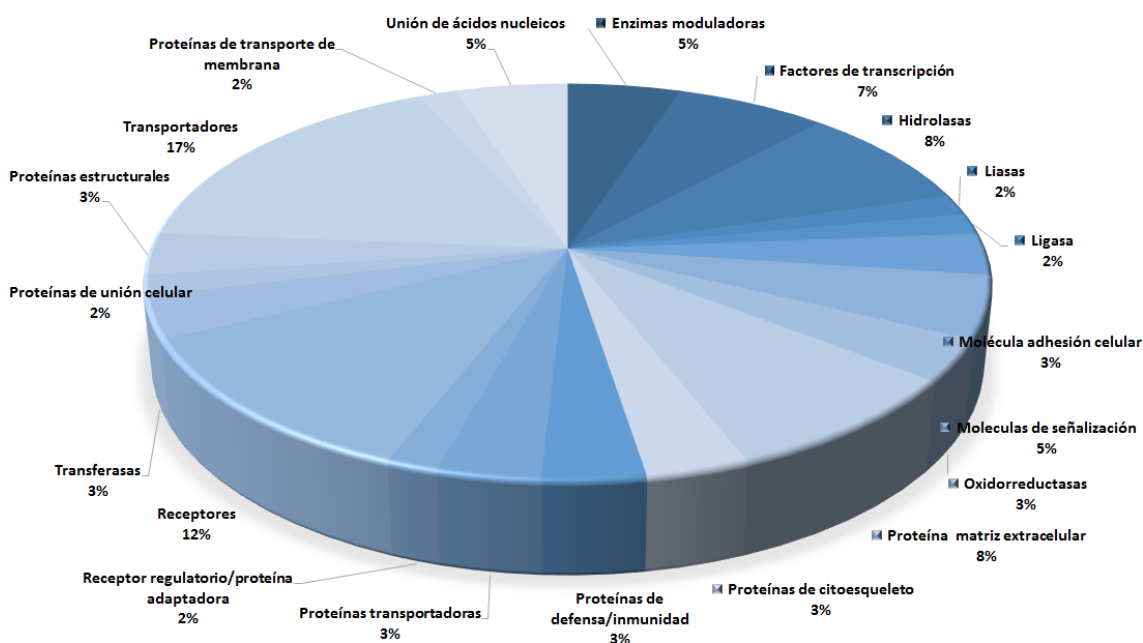


Figura 21. Distribución porcentual de los diferentes tipos de proteínas codificadas por los genes diferencialmente expresados del anexo I.

En el caso de tipos de proteínas, se encuentra una clasificación con 20 categorías con una representación de genes desigual. Se observan varias categorías con sólo uno o dos genes representados. El que aparece en más categorías es el gen *Cav1*, seguido de *Cd163*, *Dcn*, *Igfn1* y *Myo15*, no encontrándose ninguno de los 5 en la categoría con más representación, **transportadores**, como se observa en la Tabla 6.

| Transportadores | Receptores | Factor de transcripción | Unión de ác. nucleicos | Proteínas de matriz extracelular | Hidrolasas |
|---|---------------------------|-------------------------------------|--------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| <i>Abcc2</i> | <i>Cd163</i> | <i>Fhl2</i> | <i>Junb</i> | <i>Den</i> | <i>Atp2a3</i> |
| <i>Atp2a3</i> | <i>Dcn</i> | <i>Junb</i> | <i>Npas4</i> | <i>Islr</i> | <i>Bace2</i> |
| <i>Gpr98</i> | <i>Gpr83</i> | <i>Npas4</i> | <i>Smg1</i> | <i>Lum</i> | <i>C1s</i> |
| <i>Grin2c</i> | <i>Islr</i> | <i>Sertad1</i> | | <i>Myom1</i> | <i>Cd163</i> |
| <i>Slc13a4</i> | <i>Lum</i> | | | <i>Ogn</i> | <i>Igfn1</i> |
| <i>Slc22a12</i> | <i>Ogn</i> | | | | |
| <i>Slc28a1</i> | <i>Sfrp2</i> | | | | |
| <i>Slc6a12</i> | | | | | |
| <i>Slc6a13</i> | | | | | |
| <i>Ttr</i> | | | | | |
| | | | | | |
| Proteínas de unión celular | Moléculas de señalización | Enzimas moduladoras | Proteína citoesquelética | Transferasas | Óxidorreductasa |
| <i>Myo15</i> | <i>Dcn</i> | <i>Cav1</i> | <i>Krt19</i> | <i>Smg1</i> | <i>Aldh1a2</i> |
| | <i>Sfrp2</i> | <i>Myo15</i> | <i>Myo15</i> | <i>Wnk4</i> | <i>Cd163</i> |
| | <i>Traf5</i> | <i>Rem2</i> | | | |
| Proteínas de defensa / inmunidad | Liasas | Proteínas de transporte de membrana | Proteína transportadora | Proteínas estructurales | Moléculas de adhesión celular |
| <i>C1s</i> | <i>Car3</i> | <i>Cav1</i> | <i>Slc22a12</i> | <i>Cav1</i> | <i>Igfn1</i> |
| <i>Igfn1</i> | | | <i>Ttr</i> | <i>Krt19</i> | <i>Myom1</i> |
| | | | | | |
| Receptores regulatorios / Proteínas adaptadoras | Ligasas | | | | |
| <i>Cav1</i> | <i>Rnf125</i> | | | | |

Tabla 6. Lista de genes incluidos en las categorías de tipos de proteína. Los genes en rojo aparecen más frecuentemente que ningún otro a lo largo de las categorías.

5.3.5 Rutas metabólicas.

En el caso de la clasificación funcional en relación con la pertenencia de los genes diferencialmente expresados a las diferentes rutas metabólicas se detecta un número elevado de categorías, con 29 rutas diferentes. De éstas, únicamente 7 contienen más de un gen: *ruta del receptor de GnRH*, *vía de señalización WNT*, *vía de señalización de la integrina*, *ruta de la enfermedad de Huntington*, *vía de señalización de p53*, *señalización*

estimulada por angiotensina II mediante proteínas G y beta-arrestina y mapa de señalización del receptor de la colecistoquinina (Tablas 7 y 8).

| Rutas metabólicas | Nº |
|---|----|
| Vía de señalización de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) | 6 |
| Vía de señalización de WNT | 3 |
| Vía de señalización de la integrina | 2 |
| Enfermedad de Huntington | 2 |
| Vía de señalización de p53 | 2 |
| Señalización estimulada por angiotensina II mediante proteínas G y beta-arrestina | 2 |
| Mapa de señalización del receptor de la colecistoquinina | 2 |
| <i>Metabotropic glutamate receptor group III pathway, Ionotropic glutamate receptor pathway, Apoptosis signaling pathway, Interleukin signaling pathway, Angiogenesis, Alzheimer disease-presenilin pathway, Alzheimer disease-amyloid secretase pathway, Insulin/IGF pathway-mitogen activated protein kinase kinase/MAP kinase cascade, Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway, PDGF signaling pathway, Nicotinic acetylcholine receptor signaling pathway, Cadherin signaling pathway, Muscarinic acetylcholine receptor 1 and 3 signaling pathway, Metabotropic glutamate receptor group I pathway, B cell activation, Heterotrimeric G-protein signaling pathway-rod outer segment phototransduction, Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gq alpha and Go alpha mediated pathway, Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gi alpha and Gs alpha mediated pathway, 5-Hydroxytryptamine degradation, 5-Hydroxytryptamine biosynthesis, T cell activation, TGF-beta signaling pathway.</i> | 1 |

Tabla 7. Rutas metabólicas en las que se clasifican las proteínas analizadas con el número de proteínas asociadas a cada una. Hay un total de 25 rutas, pero sólo 7 de ellas tienen más de un gen asociado (destacados en rojo). Las vías representadas en una celda agrupada, tienen asociado una proteína cada una individualmente, no colectivamente.

| GnRH | WNT | Integrina | Huntington | p53 | Angiotensina | CCKR |
|-------------|--------------|-------------|---------------|----------------|--------------|-------------|
| <i>Cav1</i> | <i>Fat3</i> | <i>Cav1</i> | <i>Fos</i> | <i>Gadd45g</i> | <i>Erg1</i> | <i>Egr1</i> |
| <i>Egr1</i> | <i>Gng13</i> | <i>Vcl</i> | <i>Grin2c</i> | <i>Thbs1</i> | <i>Egr2</i> | <i>Fos</i> |
| <i>Fos</i> | <i>Sfrp2</i> | | | | | |
| <i>Fosb</i> | | | | | | |
| <i>Junb</i> | | | | | | |
| <i>Vcl</i> | | | | | | |

Tabla 8. Lista de genes incluidos en las 7 rutas metabólicas con más genes asociados.

Los genes *Egr1*, *Cav1*, *Fos* y *Vcl* aparecen en más de una de las 7 rutas destacadas en el análisis y, *Erg1* y *Fos*, en tres de ellas.

Displaying only results with P<0.05; [click here to display all results](#)

| PANTHER Pathways | Mus musculus (REF) | Client Text Box Input | | | | |
|---|--------------------|-----------------------|----------|-----------------|-----|----------|
| | # | # | expected | Fold Enrichment | +/- | P value |
| Gonadotropin-releasing hormone receptor pathway | 236 | 6 | .61 | 9.78 | + | 5.58E-03 |
| Unclassified | 19715 | 41 | 51.23 | 80 | - | 0.00E00 |

Tabla 9. Resultado del test de representación estadística realizado en PANTHER con los datos de rutas metabólicas como objeto. Sólo la ruta del receptor de GnRH tiene significado estadístico ($p < 0,05$).

Por el especial interés en el estudio en las rutas metabólicas debido a que proporcionan datos de una asociación directa entre diversos genes, se realizó un test de sobre-representación estadística en PANTHER para los datos obtenidos en esta clasificación, con el objetivo de comprobar si alguna de las rutas se encontraba sobre-representada en el estudio de genes diferencialmente expresados comparando los dos transcriptomas del CI, lo que sugiere una importancia en los procesos epileptógenos tanto de la ruta, como de las proteínas involucradas. En dicho análisis (Tabla 9), se observó que la **ruta del receptor de GnRH** tenía un FC de 9,78, con un dato esperado de 0,61 (según la base de datos de PANTHER), siendo además la única de las rutas con una probabilidad de expresión diferencial estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$) con un valor de 5,58E-03. Tratándose, además, de la ruta con más genes asociados según el análisis anterior, parece interesante prestarle atención en el contexto del estudio, así como a los 6 genes asociados (*Egr1*, *Fosb*, *Vcl*, *Junb*, *Fos* y *Cav1*).

Por otra parte, se analizó si existía alguna relación adicional entre las 7 rutas metabólicas más representadas del grupo de genes diferencialmente expresados al comparar ambos transcriptomas utilizando la base de datos de KEGG PATHWAY, donde se realizaron búsquedas de las rutas. Sólo se encontraron referencias a **ruta del receptor de GnRH**, **vía de señalización WNT**, **ruta de la enfermedad de Huntington** y **vía de señalización de p53**, en forma de representación esquemática de los elementos que componen dichas rutas. Examinando dichas representaciones, se encontraron relaciones y coincidencias que se pueden observar en la Fig. 22.

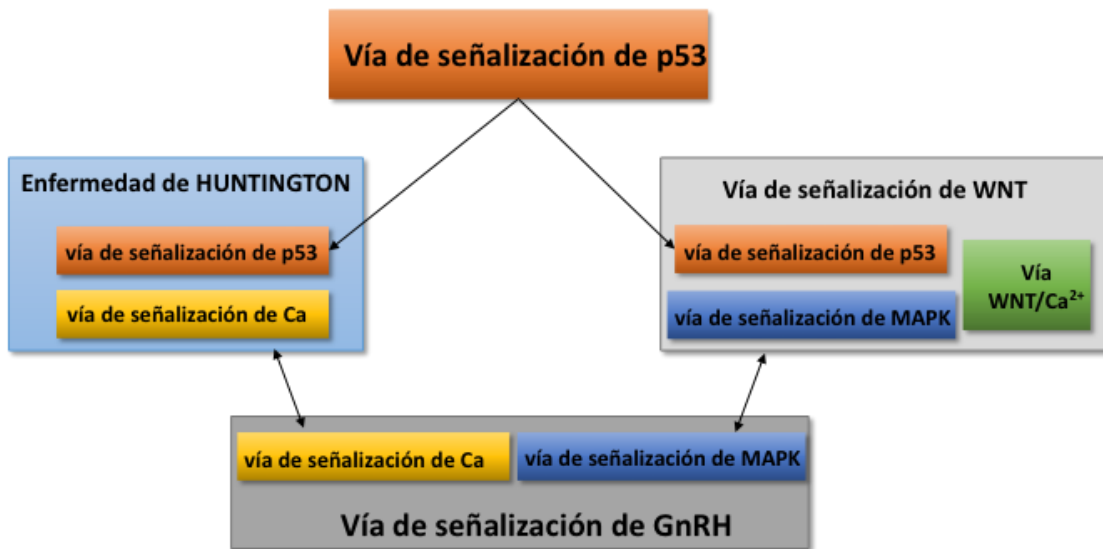


Figura 22. Esquema de coincidencias entre las rutas metabólicas con mayor número de genes asociados: la ruta del receptor de GnRH, la vía de señalización WNT, la ruta de la enfermedad de Huntington y la vía de señalización de p53. La última (en naranja) de las rutas está incluida en las dos anteriores. También existe una interesante coincidencia en el hecho de que la vía de señalización de la MAPK (en azul) y la del calcio (en amarillo) en todas las rutas, excepto la de p53.

5.3.6 Redes de interacciones.

Para completar el estudio, se realizó un análisis de las interacciones y asociaciones entre los genes de la muestra usando STRING 10.0 y su análisis basado en asociaciones directas e indirectas y derivado de análisis computacional. STRING identificó 56 de los 58 genes en su base de datos.

El análisis reveló un número significativamente más elevado del esperado de interacciones entre los elementos de la red (con respecto a un grupo al azar con elementos similares), lo que indica que esos elementos deben estar, al menos de forma parcial, conectados biológicamente, algo que se esperaba que se pudiera confirmar en el estudio teniendo en cuenta la naturaleza de los genes y su origen (Fig. 23).

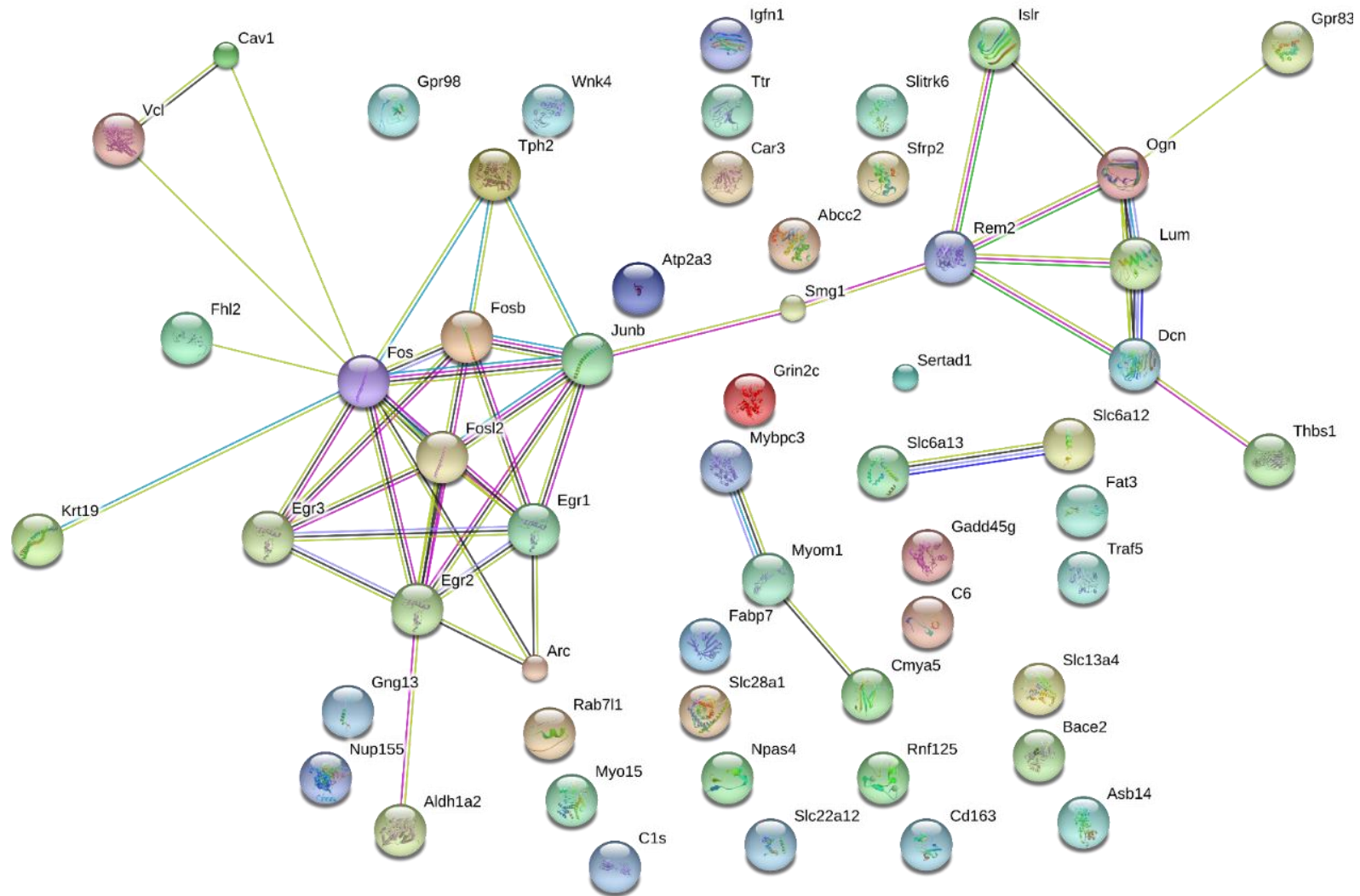


Figura 23. Red de interacciones entre las proteínas de los genes del estudio. Las líneas representan las diferentes interacciones encontradas en la base de datos de STRING: de bases de datos organizadas (azul claro), determinadas experimentalmente (magenta), proximidad (verde), co-ocurrencia (azul oscuro), fusiones (rojo), búsquedas bibliográficas (amarillo), co-expresión (negro) y homología de proteínas (gris).

En la red de interacciones se observa un grupo de proteínas codificantes de los genes diferencialmente expresados fuertemente relacionadas y, concretamente, un núcleo dentro de la red que aparece vinculado de manera importante y está formado por las proteínas implicadas en la **ruta del receptor de GnRH** anteriormente señalada (*Egr1*, *Fosb*, *Vcl*, *Junb*, *Fos* y *Cav1*), *Fosl2*, *Egr2*, *Egr3* o *Arc*. La red de interacciones también parece apoyar la posible relación entre *Lum* y *Ogn* señalada en el apartado 5.3.3, ya que se encuentran en el otro núcleo importante, que completan *Dcn*, *Rem2* y *Islr*. Ambos núcleos se encuentran unidos en la red por *Smg1*.

Para confirmar que las proteínas implicadas en la **ruta del receptor de GnRH** tienen importancia dentro de la red y sus posibles relaciones entre sí, se creó otra red de interacciones usando únicamente las proteínas presentes en las 7 rutas metabólicas señaladas como más importantes en el apartado 5.3.5. En el resultado (Fig. 24) se aprecia que las interacciones se limitan a los genes dentro de la ruta destacada, lo que parece confirmar un fuerte vínculo a nivel biológico y de expresión.

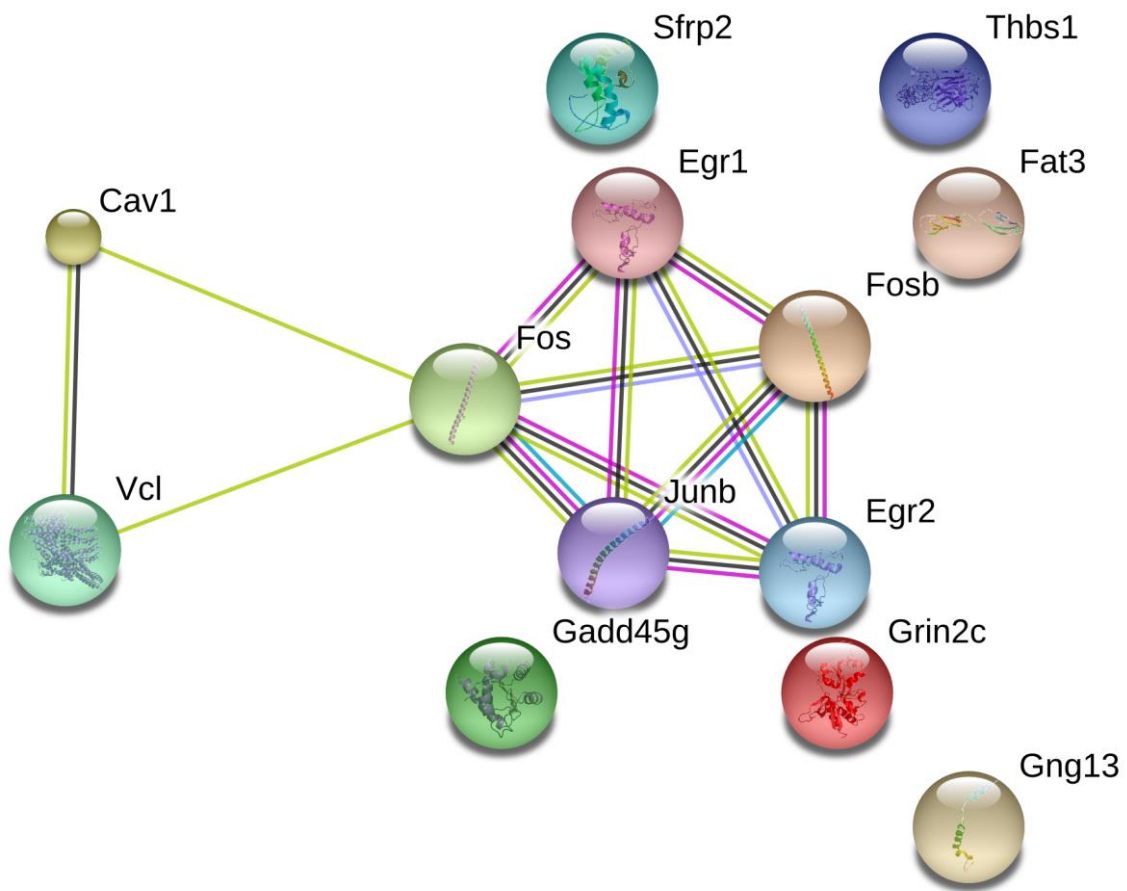


Figura 24. Red de interacciones entre las proteínas de los genes incluidos en las 7 rutas metabólicas con más número de genes asociados. Se observa un núcleo de asociaciones al que pertenecen las 6 proteínas asociadas a la ruta del receptor de GnRH, el que más representación tiene en el análisis realizado, además de *Egr2*. Las líneas representan las diferentes interacciones encontradas en la base de datos de STRING: de bases de datos organizadas (azul claro), determinadas experimentalmente (magenta), proximidad (verde), co-ocurrencia (azul oscuro), fusiones (rojo), búsquedas bibliográficas (amarillo), co-expresión (negro) y homología de proteínas (gris).

5.4 Genes diferencialmente expresados en la comparación entre el transcriptoma del CI del hámster sirio GASH-Sal y el de su control relacionados con procesos epilépticos.

Usando los datos de aportados por *The Comparative Toxicogenomics Database*, se pudo obtener información sobre fenotipos asociados a 13.213 genes de la lista completa (de 102.277 genes) de genes de expresión diferencial al comparar los transcriptomas del CI al que se refiere esta tesis.

Seguidamente, se realizó una búsqueda de fenotipos relacionados con la epilepsia, por lo que se utilizaron los términos “*epilepsy*”, “*epilepsies*” y “*seizure*” en tal búsqueda (Anexos 2, 3 y 4, respectivamente).

Se observó que sólo uno de los genes encontrados en la búsqueda, *Gpr98*, aparecía en el análisis del apartado 5.3. Esto es debido a que la mayoría de los resultados encontrados en la búsqueda por fenotipo asociado, no cumplen simultáneamente los criterios utilizados en el análisis del punto 5.3 ($p \leq 0,05$ y $FC \geq 2$). Pese a ello, se considera importante la recopilación de estos genes (Anexos 2, 3 y 4) por su relación ya conocida con la epilepsia y, de forma más amplia, con convulsiones o crisis.

En la tabla 10, se observan los genes con fenotipos asociados a los términos mencionados anteriormente y relacionados con la epilepsia que cumplen, en cada una de las búsquedas, por lo menos uno de los criterios utilizados en el análisis del punto 5.3, y *Gpr98*, que cumple ambos y por eso se encontró ya en dicho análisis.

| | FC | <i>p</i> | Control | GASH:Sal |
|---|--------------|-------------|-------------|-------------|
| "Epilepsy", $FC \geq 2$ | | | | |
| <i>Depdc5</i> | 4,485049834 | 0,593252229 | 1,055847913 | 4,735530506 |
| <i>Mbp</i> | -6,317283951 | 0,078380768 | 17,94941452 | 2,841318303 |
| "Epilepsy", $p \leq 0.05$ | | | | |
| <i>Glu1</i> | 1,173041382 | 0,023271223 | 7709,801459 | 9043,91616 |
| <i>Actb</i> | 1,149626979 | 0,039625157 | 13155,86499 | 15124,33733 |
| "Seizure", $FC \geq 2$ | | | | |
| <i>Il6r</i> | 2,332225914 | 0,459517612 | 5,279239564 | 12,31237931 |
| <i>Gpr98</i> | -2,273347858 | 0,010727248 | 109,8081829 | 48,30241116 |
| <i>C7</i> | -5,016666667 | 0,095902215 | 19,00526243 | 3,788424404 |
| "Seizure", $p \leq 0.05$ | | | | |
| <i>Gpr98</i> | -2,273347858 | 0,010727248 | 109,8081829 | 48,30241116 |
| <i>Plp1</i> | 1,189953462 | 0,007877543 | 32456,76484 | 38622,0397 |

Tabla 10. Lista de genes encontrados en las tres búsquedas anteriores (“*epilepsy*”, “*epilepsies*” y “*seizure*”) que cumplen al menos uno de los criterios de valor de FC y significación de *p*. En rojo, *Gpr98*, único gen que los cumple simultáneamente.

Además de los datos de fenotipos asociados, se utilizó otra fuente de información que proporcionara información sobre genes relacionados con procesos epileptógenos: la lista de 71 genes de la EGI [*Epilepsy Genetics Initiative*: <http://www.cureepilepsy.org/egi/genes.asp>], los cuales ya han sido identificados como relacionados con la epilepsia [EpiPM Consortium, 2015]. Dicha lista se cruzó con la lista completa de genes de expresión diferencial al comparar los transcriptomas del CI para encontrar cuántos de estos genes, cuya relación con la epilepsia ya se encuentra determinada, aparecen en ella: se hallaron 50 (Anexo 5), ninguno de los cuales ha aparecido en el estudio del punto 5.3, pero 10 de ellos (Tabla 11) se encuentran entre los identificados en las búsquedas relacionadas en los fenotipos asociados (Anexos 2, 3 y 4).

| <i>Gen</i> | FC | <i>p</i> | Control | GASH:Sal |
|----------------|--------------|------------|----------------|-----------------|
| <i>Depdc5</i> | 4,485049834 | 0,59325229 | 1,05584791 | 4,73553051 |
| <i>Charn2</i> | 1,750616225 | 0,06293346 | 65,4625706 | 114,599838 |
| <i>Aldh7a1</i> | 1,151566849 | 0,30520347 | 468,796473 | 539,850478 |
| <i>Cntnap2</i> | 1,099731569 | 0,42316046 | 714,809037 | 786,098064 |
| <i>Gabrg2</i> | 1,068574473 | 0,44989651 | 1981,82653 | 2117,72924 |
| <i>Epm2a</i> | 1,146179402 | 0,50874155 | 190,052624 | 217,834403 |
| <i>Gabra1</i> | 1,01146686 | 0,87477726 | 6959,09359 | 7038,89254 |
| <i>Kcnq2</i> | -1,050187869 | 0,63104871 | 1235,34206 | 1176,30578 |
| <i>Scn9a</i> | -1,103554059 | 0,57276483 | 310,419286 | 281,290512 |
| <i>Kcnq3</i> | -1,305321144 | 0,22501315 | 195,331864 | 149,642764 |

Tabla 11. Lista de genes resultantes de la búsqueda cruzada entre los genes de la lista de la EGI y los identificados en las búsquedas relacionadas en los fenotipos asociados.

Con el objetivo de determinar si el grupo de genes coincidentes entre la lista de la EGI y la de genes de expresión diferencial al comparar los transcriptomas del CI (Anexo 5) resulta similar al grupo de genes analizados (Tabla 2) en cuanto a las rutas metabólicas en las que participan las proteínas. Así, se quiere comprobar si el grupo de genes analizado de entre los genes diferencialmente expresados en la línea de hámster sirio GASH:Sal en comparación con la de los hámsteres control en el punto 5.3

resulta similar en este aspecto a un conjunto de genes que ya se han probado relacionados con la epilepsia de algún modo. El análisis se realizó utilizando PANTHER del mismo modo que anteriormente (5.3.5) y los resultados apuntan a rutas coincidentes con aquel análisis (13 de 31 obtenidas, la mayor parte rutas con varios genes asociados). Especialmente destacada, la coincidencia de 5 de las 7 rutas metabólicas que se destacaron en el apartado 5.3.5, vía del receptor de GnRH, mapa de señalización del receptor de la colecistoquinina, enfermedad de Huntington, señalización estimulada por angiotensina II mediante proteínas G y beta-arrestina y vía de señalización WNT.

| Ruta metabólica | Nº |
|---|----|
| Vía de señalización de receptores acetilcolina muscarina 1 y 3 | 4 |
| Vía del receptor de glutamato metabólico grupo III | 3 |
| Vía del receptor de glutamato ionotrópico | 3 |
| Vía del receptor de GnRH | 3 |
| Vía del receptor de glutamato metabólico grupo I | 3 |
| Mapa de señalización del receptor de la colecistoquinina | 3 |
| Enfermedad de Huntington | 3 |
| Vía de señalización de la inflamación mediada por citoquinas y quimiocinas | 2 |
| Vía de señalización de proteína G heterotrimérica mediada por Gq- α | 2 |
| Vía de señalización de cannabinoides endógenos | 2 |
| Señalización estimulada por angiotensina II mediante proteínas G y beta-arrestina | 1 |
| Vía de señalización de WNT | 1 |
| Degradación de 5-hidroxitriptamina | 1 |
| Vía de señalización de TGF- β | 1 |
| <i>Histamine H1 receptor mediated signaling pathway, p38 MAPK pathway, Opioid proopiomelanocortin pathway, Opioid prodynorphin pathway, Alpha adrenergic receptor signaling pathway, Enkephalin release, Endothelin signaling pathway, 2-arachidonoylglycerol biosynthesis, Thyrotropin-releasing hormone receptor signaling pathway, Oxidative stress response, Oxytocin receptor mediated signaling pathway, Muscarinic acetylcholine receptor 2 and 4 signaling pathway, Metabotropic glutamate receptor group II pathway, Synaptic vesicle trafficking, 5HT2 type receptor mediated signaling pathway, 5HT1 type receptor mediated signaling pathway, GABA-B receptor II signaling.</i> | 1 |

Tabla 12. Rutas metabólicas asociadas al grupo de genes coincidentes entre la lista de la EGI y la de genes de expresión diferencial al comparar los transcriptomas del CI (Anexo 5) y el número de proteínas implicadas en cada una de ellas. El análisis de PANTHER dejó un total de 31 rutas. Destacadas en rojo, las rutas que aparecieron en el análisis del apartado 5.3.5 y, destacadas en azul, las rutas coincidentes con las destacadas en ese apartado. Las vías representadas en una celda agrupada, tienen asociado una proteína cada una individualmente, no colectivamente.

5.5 Validación por RT-qPCR de algunos de los genes diferencialmente expresados en la línea de hámster sirio GASH:Sal en comparación con la de los hámsteres control.

Para validar parte de los datos obtenidos en el transcriptoma del CI correspondiente a las cepas audiógenas y controles estimulados con sonido, se realizaron análisis RT-qPCR que incluyeron la expresión de la familia de genes de respuesta de crecimiento temprano (*Early Grown Response*) *Egr* (*Egr1*, *Egr2* y *Egr3*) en las muestras experimentales, comparadas con las de control (hámster sirio). Los valores de expresión de los análisis RT-qPCR y los análisis del transcriptoma, mostraron un aumento significativo de los valores de expresión de los *Egr1*, *Egr2* y *Egr3*; mientras que en el análisis del microarray, se halló un incremento en la expresión tanto del gen *Egr2* como de *Egr3*, pero no en el caso de *Egr1*. Los resultados de estos experimentos se pueden observar en la Fig. 25.

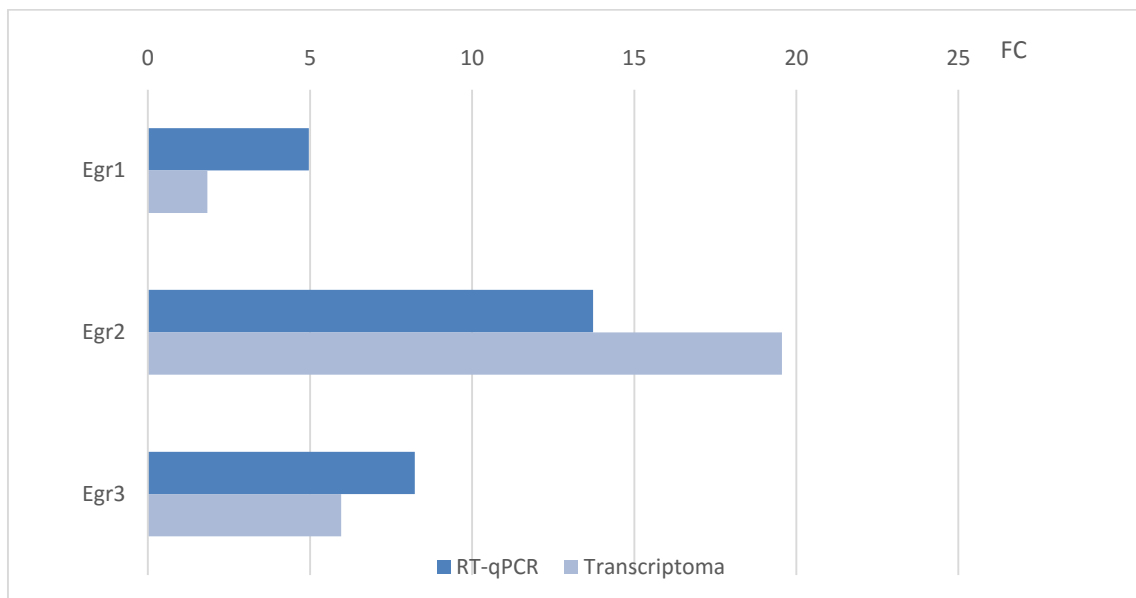


Figura 25. Confirmación a nivel de expresión génica de los resultados para los genes seleccionados. Los FC (relativos a los niveles de ARNm) en los tres genes en el CI de las GASH:Sal estimulados comparados con los controles estimulados fueron obtenidos mediante RT-qPCR, y análisis del transcriptoma.

5.6 Comparación de la expresión génica del CI tras una crisis epiléptica con el modelo de epilepsia audiogénica WAR.

La comparación de la expresión génica del CI tras una crisis epiléptica en el caso de la línea de hámsteres GASH:Sal con otro modelo de epilepsia ya establecido, en este caso el de la rata WAR, puede permitir determinar las similitudes y diferencias en ambos modelos. Para ello, se comparó la expresión de los genes *Egr1*, *Egr2*, *Egr3* y *Gabra4* (subunidad $\alpha 4$ del receptor GABA-A) en ambos modelos, tanto en el caso del control estimulado y GASH:Sal y WAR estimulados, como el de control no estimulado y GASH:Sal y WAR estimulados.

Se observó que los tres genes de respuesta de crecimiento temprano *Egr1*, *Egr2* y *Egr3* estaban significativamente sobre-expresados, tanto en el caso de GASH:Sal y como en el de WAR, al compararlos estimulados con sus respectivos controles estimulados (Fig. 26, A y B). El valor del incremento expresión de *Egr3* y *Egr2*, en el caso de la comparación entre ratas Wistar y WAR estimuladas, fue extraordinariamente elevado (Fig. 26, B), 10 veces superior a lo observado en la comparación entre los hámsteres GASH:Sal y su control estimulados (Fig.26, A).

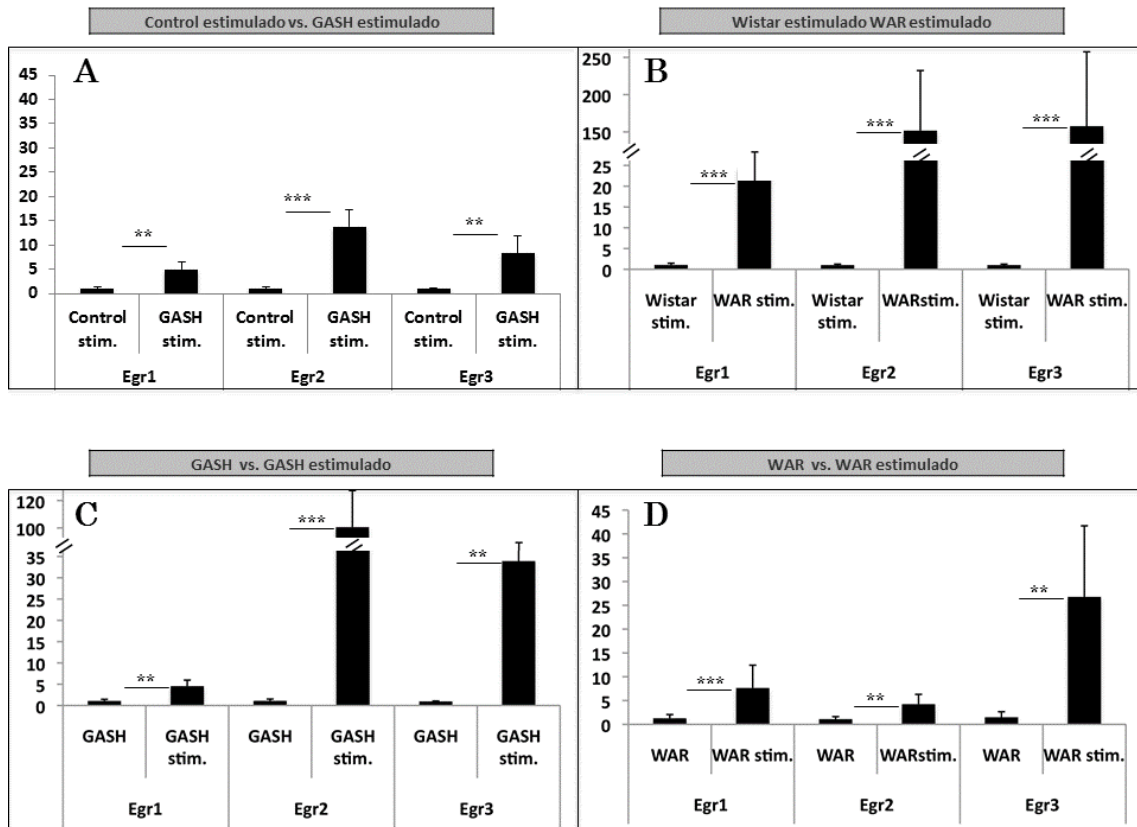


Figura 26. Los FC en la expresión de la transcripción de los genes *Egr*, en GASH:Sal, WAR y controles respectivos, fueron medidos mediante RT-qPCR. Se observó incremento significativo de la expresión en ambos modelos de crisis audiógenas en contraste con los controles y los niveles basales. La desviación estándar se indica con barras de error. El gen constitutivo usado fue β -actina. Los precursores de la RT-qPCR pueden encontrarse en la Tabla 1.

Las diferencias representativas están indicadas como $p < 0.01$ (**) o $p < 0.001$ (***).

Además, se determinó el efecto de la estimulación sonora en la expresión génica en el CI, analizando la expresión de los genes *Egr* mediante RT-qPCR en dos cepas con y sin dicha estimulación, comparando la expresión en el CI en las cepas control con la de las cepas audiógenas estimuladas (Fig. 26, C y D).

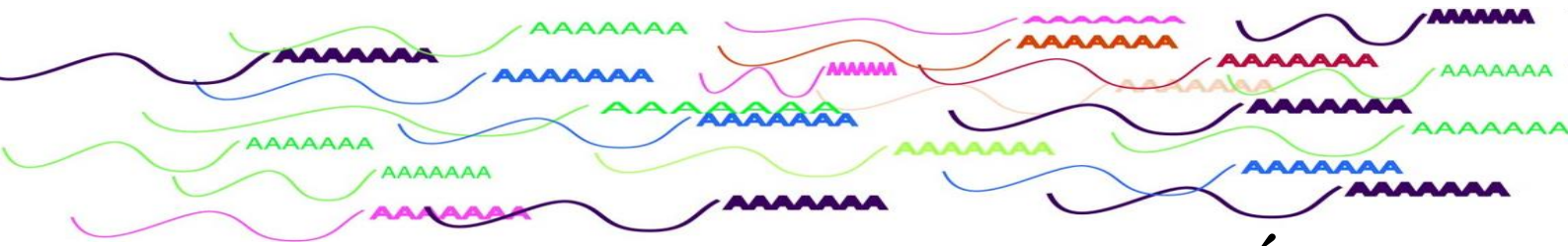
La comparación de expresión génica entre GASH:Sal con y sin estimulación, indicó que la expresión de los tres genes de respuesta de crecimiento temprano fue significativamente más elevada en el caso de la cepa GASH:Sal estimulada, 100 veces superior, de hecho, a la no estimulada (Fig. 26, C). En el caso de la rata WAR, comparando los niveles entre estimuladas y no estimuladas, se hallaron resultados en el mismo sentido, aunque no tan

drásticos, siendo de nuevo la sobre-expresión de los genes *Egr* significativa (Fig. 26, D). Concretamente, los resultados de la expresión de los genes *Egr1* y *Egr3* fueron similares a los encontrados en la comparación anterior que implicaba a GASH:Sal; mientras que la expresión de *Egr2* se encontró ligeramente superior en la WAR estimulada en comparación con la no estimulada, pero no en los niveles observados en el caso de la comparación de GASH:Sal.

| Símbolo del gen | Descripción del gen | Control estim. vs. GASH estim. | | | RT-qPCR p-valor | GASH vs. GASH estim. | | RT-qPCR p-valor |
|-----------------|--|--------------------------------|-----------------|--------------------|--------------------|----------------------|--------------------|--------------------|
| | | RT-qPCR | | RT-qPCR | | | | |
| | | Control estim. | GASH estim. | GASH | | GASH estim. | | |
| GABRa4 | Receptor (GABA) A: Ác. gamma-aminobutírico, subunidad α 4 | 1.02 \pm 0.27 | 0.79 \pm 0.20 | NS | 1.10 \pm 0.39 | 0.94 \pm 0.24 | NS | |
| | | Wistar estim. vs. WAR estim. | | | | WAR vs. WAR estim. | | |
| Símbolo del gen | Descripción del gen | RT-qPCR | | RT-qPCR p-valor | RT-qPCR | | RT-qPCR p-valor | |
| | | Wistar estim. | WAR estim. | | WAR | WAR estim. | | |
| GABRa4 | Receptor (GABA) A: Ác. gamma-aminobutírico, subunidad α 4 | 1.01 \pm 0.19 | 4.56 \pm 1.29 | < 0.001 (***) | 1.13 \pm 0.70 | 1.42 \pm 0.89 | NS | |

Tabla 13. Nivel de expresión del gen *GABRa4* en el CI de GASH:Sal y WAR y sus respectivos controles, medidos mediante RT-qPCR. En rojo, sobre-expresados; en verde, infra-expresados. El gen constructivo usado fue β -actina. Los precursores de la RT-qPCR pueden encontrarse en la Tabla 1. Las diferencias representativas están indicadas como $p < 0.001$ (***)

Finalmente, se realizó un análisis RT-qPCR en otros genes relacionados con las funciones de *Egr3*, como el gen que codifica el ácido gamma-aminobutírico (GABA) receptor A, α 4 (*GABRa4*), pese a no haberse detectado una desregulación tan importante en el análisis de microarray. El resultado mostró que la expresión del gen que codifica la subunidad α 4 del receptor GABA no sufría cambios significativos en el CI de GASH:Sal bajo ninguna de las circunstancias en las que se realizó el estudio (Fig. 26, A y C). Sin embargo, la expresión de *GABRa4* se halló significativamente alterada en el CI de la rata WAR estimulada en comparación con el control estimulado correspondiente, como se puede observar en la Tabla 13.



6. DISCUSIÓN

La epilepsia es una enfermedad neurológica con un alto impacto epidemiológico en el mundo, por lo cual es de sumo interés la investigación de los componentes fisiopatológicos que puedan generar nuevos tratamientos farmacológicos. En esta búsqueda, se ha realizado un estudio de los genes que se expresan diferencialmente en el núcleo epileptógeno en la cepa de hámster GASH:Sal tras una crisis convulsiva audiogénica, en comparación con hámsteres controles sometidos al mismo proceso de estimulación acústica.

Tras un proceso de filtrado estadístico, se seleccionaron 58 genes que se expresan de forma diferencial al menos 2 veces en relación a los controles. Estos genes codifican factores de transcripción (*Fos, Fosb, Fosl2, Egr1, Egr2, Egr3, Junb, Npas4, Sertad1*), proteínas estructurales de membrana (*Bace2, Cav1, Fat3, Nup155, Slitrk6*), de la matriz extracelular (*Dcn, Fhl2, Lum, Ogn, Thbs1*), proteínas asociadas al citoesqueleto (*Arc, Cmya5, Dcdc5, Igfn1, Islr, Krt19, Mybpc3, Myo15, Myom1, Tmsb15b, Vcl*), transportadoras (*Abcc2, Atp2a3, Rab29, Slc13a4, Slc22a12, Slc28a1, Slc6a12, Slc6a13, Ttr*), receptores de glutamato (*Grin2c*), receptores acoplados a proteínas G (*Gng13, Gpr83, Gpr98*), proteínas de señalización para la degradación celular (*Asb14, Rnf125, Sfrp2, Traf5*), proteínas que median la respuesta inflamatoria (*C1s, C6, Cd163*), proteínas que median la respuesta al estrés (*Fabp7, Gadd45g, Smg1*), proteínas de señalización RAS (*Rab29, Rem2*) y enzimas del metabolismo celular (*Aldh1a2, Car3, Rnf125, Tph2, Smg1, Wnk4*).

6.1 Discusión metodológica y consideraciones técnicas.

6.1.1 Técnicas de Biología Molecular.

El TRIzol® es el reactivo ideal para la recogida del material porque es una solución monofásica de fenol, tiocianato de guanidinio que, de manera simultánea, estabiliza material biológico y desnaturaliza proteínas,

manteniendo la integridad del ARN inhibiendo efectivamente la actividad de la ARNasa (ribonucleasa) [Rio y cols., 2010].

Los controles de los métodos científicos son fundamentales para asegurar la exactitud de los resultados obtenidos. Así, en las técnicas de Biología Molecular, que proporcionan gran cantidad de datos de forma automatizada, se exigen controles muy buenos y fiables para las diferentes etapas del protocolo.

La calidad del ARN extraído y purificado se evaluó a través de un bioanalizador que reconoce la integridad de las bandas 18S y 28S del ARNr y también el número de integridad del ARN (RIN), correspondiendo el 0 a un ARN totalmente degradado y el 10 a un ARN completamente intacto. Para todos los experimentos, sólo se han usado aquellas muestras que presentaran un RIN mayor a 7,5, aunque la gran mayoría se encontraban en torno a 8,0.

En la realización del transcriptoma, el estudio de duplicación en los procesos de RNA-seq es un indicador de la calidad en el proceso de secuenciación y es un claro indicador de degradación del material biológico de partida o desviaciones importantes en la secuenciación. Sólo se utilizó material cuando fue observado un número bajo o nulo de duplicados, tanto en las lecturas iniciales como en las mapeables. En el presente trabajo no se detectó ninguna anomalía o desviación en ninguno de los controles de calidad por muestra.

Existen numerosos estudios [Hansen e Irizarry, 2011; Risso y cols., 2011] que indican la necesidad de normalizar los datos de cuantificación para la eliminación de diferentes desviaciones estadísticas que pueden distorsionar todo el análisis posterior. Debido a la naturaleza de la secuenciación mediante RNA-seq, las desviaciones de mayor peso son la longitud del gen y el tamaño de librería por muestra. Debido a la naturaleza del proceso de secuenciación de RNA-seq, existe una gran dependencia entre el tamaño del gen y su expresión. Este hecho es debido a que es estadísticamente más probable secuenciar los fragmentos de los genes de mayor tamaño,

generándose una desviación estadística que puede alterar los siguientes procesos del análisis. Es posible eliminar esta dependencia mediante los correctos pasos de normalización. En este estudio, mediante los procesos de normalización, no se observó ninguna correlación entre las variables mencionadas.

6.2 Análisis de genes diferencialmente expresados en el transcriptoma.

Un análisis “estricto” de los genes diferencialmente expresados entre los transcriptomas (GASH:Sal vs. controles) muestra una serie de genes que podrían tener una importancia capital dentro del contexto del estudio. Por su mayor nivel de expresión diferencial destacan 6 genes: *Ttr* (21,14), *Egr2* (18,67), *Slc28a1* (13,90), *FosB* (12,15), *Atp2a3* (-5,49) y *C6* (-10,03).

El gen *Ttr*, codifica la transtiretina, tiene los niveles de expresión diferencial más elevados del estudio, más de 20 veces superior en GASH:Sal que en el control. Esta proteína está estrechamente asociada con diversos tipos de amiloidosis, así como con crisis convulsivas o demencia, habiéndose detectado una sobre-expresión del gen que la codifica en la corteza prefrontal de ratones afectados por estrés crónico suave [Lisowski y cols., 2013], sobre-expresión que también se identifica en otro de los genes aquí destacados, *Egr2*, en el cerebro de ratones Pah(enu2), que presentan crisis convulsivas y trastornos del movimiento y comportamiento [Park y cols., 2009]. Mutaciones de *Ttr* originan crisis convulsivas asociadas a depresión [Roe y cols., 2007; Blevins y cols., 2003; Brett y cols., 1999].

Slc28a1, codifica la proteína 1 de la familia 8 de transportadores de nucleósidos asociados a sodio [Niitani y cols., 2010]. Esta es la primera vez que se relaciona con procesos epileptógenos o crisis convulsivas de cualquier tipo hasta donde se ha podido investigar, pero sí hay numerosos trabajos sobre este gen en relación a la hepatitis B [Yuan y cols., 2016; Wang y cols., 2014], cáncer pancreático [Mohelnikova-Duchonova y cols., 2013; Woo y cols., 2012; Bhutia y cols., 2011], cáncer de mama [Wong y cols., 2011] o

diabetes [Rodríguez-Mulero y cols., 2005].

FosB, se trata también un gen sobre-expresado (FC = 12,15) en cuanto a su expresión diferencial y con un valor de *p* asociado bajo (1,679E-10). Ha sido ampliamente relacionado con trastornos similares al del presente estudio y ha sido fundamental para proporcionar una base genética y molecular a la comorbilidad de depresión y epilepsia con neurogénesis anormal [Yutsudo y cols., 2013]. Además, se ha observado la sobre-expresión de *FosB* y otra de sus isoformas ($\Delta FosB$) en ratones con supresión del gen *Fmr1*, los cuales presentan crisis audiógenas [Curia y cols., 2013]. También, se ha asociado un incremento en la expresión de *FosB* en ratas y ratones sometidas a estrés crónico [Schmeltzer y cols., 2015; Kormos y cols., 2016]. Del mismo modo, se ha demostrado la importancia de *FosB* en procesos a nivel molecular, celular y de comportamiento en crisis electroconvulsivas de ratones *FosB*^{-/-} [Hiroi y cols., 1998]. Este tipo de ratones tiene predisposición a padecer crisis convulsivas, y la expresión crónica de $\Delta FosB$ causada por crisis provocadas por ácido kaínico puede ser indicativo de un papel compensatorio/protector en la fisiopatología de la epilepsia [Mandelzys y cols., 1997]. Sin embargo, en este mismo tipo de crisis, se ha descrito que después de ser reducidas en cantidad y duración por medio del neuropéptido. Y en ratas, no se apreciaba un descenso de los niveles de expresión de *FosB* y *JunB* en la zona del hipocampo [Madsen y cols., 1999], lo que puede apuntar, como señalamos, a un posible descarte del papel de estos genes en las crisis, pero también a las particularidades del modelo utilizado o a que la reducción en expresión de otros genes implicados con el uso de neuropéptido Y afecte a las crisis en sí, pero no a la expresión de *FosB* o *JunB*.

Atp2a3 o *SERCA3*, que codifica una ATPasa del retículo sarcoplásmico/retículo endoplásmico, implicada en el transporte de Ca²⁺, y está infra-expresada en nuestro estudio. Parece estar relacionado en procesos cancerígenos [Contreras-Leal y cols., 2015; Feng y cols., 2013; Korosec y cols., 2009; Xu y cols., 2012;] y diabéticos [Liang y cols., 2011; Estrada y cols., 2012], aunque aún no se haya relacionado con procesos

epileptógenos.

En el caso de *C6*, se halló fuertemente infra-expresado, y se observó durante el estudio que la presencia del gen aparecía destacada en varios de los análisis y clasificaciones, siempre por la amplia variedad de su implicación en diferentes procesos biológicos y moleculares, así como la diversidad de funciones de las proteínas codificadas.

Se ha demostrado que la deficiencia de *C6* en ratas PVG/c no reducía las crisis epilépticas inducidas eléctricamente [Holtman y cols., 2011], algo que se puede conciliar fácilmente con los datos obtenidos en el transcriptoma de este estudio, en el que hay infra-expresión del gen. Explorando esa misma deficiencia en ratas *C6(-/-)*, se observó que la misma no afecta a la capacidad de regeneración de nervios periféricos después de una lesión por aplastamiento [Sta y cols., 2014]. Por el contrario, se ha demostrado que la deficiencia genética de *C6* en ratas con daños en el nervio ciático, acelera la regeneración y recuperación axonal [Ramaglia y cols., 2009]. Por otra parte, también se ha detectado la expresión de *C6*, junto con otros factores de complemento (*C1q*, *C1s*, *C2*, *C3*, *C4*, *C5*, *C7*, *C8* y *C9*) en los oligodendrocitos de humanos adultos que habían sido sometidos a resección del lóbulo temporal para tratar epilepsia [Hosokawa y cols., 2003], sugiriendo que estas células son la fuente de estas proteínas complemento, y, como consecuencia, tienen un papel clave en diversas enfermedades neurodegenerativas e inflamatorias del sistema nervioso central, como la enfermedad de Alzheimer o la esclerosis múltiple. Además, se ha demostrado en ratones que la deficiencia de *C6* mejoraba la coagulación [Carrera-Marín y cols., 2012] y estaba implicada en la artritis inducida por anticuerpos de colágeno [Banda y cols., 2012]. En conclusión, parece claro el interés del estudio de modelos en los que exista una deficiencia de *C6*, y en el caso que nos ocupa, el nivel de expresión de GASH:Sal fue 10 veces menor que en los controles trol, lo que sugiere que el descenso de su expresión no parece relacionada con las crisis directamente.

En cuanto al papel de *Egr2*, se explorará con más detalle en un apartado

posterior, junto con los otros miembros de la familia *Egr* que fueron detectados expresados diferencialmente en el análisis de la expresión diferencial del transcriptoma del CI de la línea de hámster sirio GASH:Sal en comparación con el del hámster control.

Otros genes que aparecen de forma frecuente en este estudio son *Cav1*, *Fos*, *VCL*, *JunB*, *Myo15*, *Grin2c*, *Lum*, *Ogn* y *Cd163*. Los cuatro primeros aparecen implicados, junto con *FosB*, en la ruta del receptor de GnRH, ruta que se ha revelado como la más llamativa en cuanto a lo prominente de su valor de expresión respecto a lo esperado (con un FC de 9,10 frente al dato esperado de 0,55), resultando la única ruta que en el análisis estadístico tenía un valor de $p < 0,05$ ($3,50E-02$), y siendo la ruta con más genes asociados según el análisis realizado anteriormente (Tabla 7). En esta ruta metabólica, se ha estudiado en muchos casos la relación entre los niveles de la hormona liberadora de gonadotropina y los procesos epileptógenos, así como la forma en que esos procesos afectan a la GnRH. Estas relaciones han llevado a descubrir estrechos lazos en el humano entre la GnRH y otras hormonas sexuales con la epilepsia, probablemente por las alteraciones que la enfermedad pueda producir en el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal [Fawley y cols., 2006; Morris y Vanderkolk, 2005; Gulati y cols., 2002], hablándose incluso de una reducción de la fertilidad en pacientes con epilepsia [Nappi y cols., 1994]. No obstante, hay resultados contradictorios, descartándose el vínculo entre la GnRH y la epilepsia en un estudio de epilepsia del lóbulo temporal causada por pilocarpina [Fawley y cols., 2012], aunque esta relación se describe en un modelo de rata [Amado y cols., 1993]. Lo que parece claro es que en el modelo de GASH:Sal y en el contexto estricto de nuestro análisis, la aparente importancia de la ruta de la GnRH parece apuntar hacia algún tipo de posible correlación entre ambos conceptos.

Pasando a comentar los genes restantes de esta ruta metabólica, existe abundante literatura que asocia *Cav1*, el gen que codifica la Caveolina-1, con procesos epileptógenos y crisis convulsivas. Se ha observado el aumento

de la expresión de *Cav1* en el hipocampo de ratas después de 10 días de tratamientos para crisis electroconvulsivas [Enomoto y cols., 2016], algo que encajaría con los datos arrojados por las medidas aquí presentadas, ya que *Cav1* aparece infra-expresado en el transcriptoma de GASH:Sal. En este mismo sentido, en los receptores de glucocorticoides de ratones, y tras la administración de glucocorticoides, se observó una reducción de la expresión de *Cav1* y otros genes, provocando daños en el sistema nervioso e inflamación [Sorrells y cols., 2013]. Se ha descrito que la predisposición a las crisis provocadas por el síndrome de abstinencia de etanol está relacionada con una sobre-expresión en el CI de la subunidad $\alpha 1$ de Cav1.3 [N'Gouemo y cols., 2015] y hay numerosas publicaciones que relacionan la subfamilia de genes *Cav1*, *Cav1.1*, *Cav1.2* y *Cav1.3* con procesos epileptógenos y crisis convulsivas [Kanyshkova y cols., 2014; Subramanian y cols., 2015; Tevoufouet y cols., 2014; Radzicki y cols., 2013; Li y cols., 2011; Kim y cols., 2008; Lv y cols., 2015].

Fos o *c-Fos*, es otro gen ampliamente relacionado en la literatura con procesos epileptógenos, algo que confirma de manera indirecta la validez de los resultados obtenidos en esta tesis doctoral. Esta relación ampliamente documentada, posiblemente tenga que ver con que la proteína nuclear que codifica, se expresa en condiciones de alta actividad neuronal y se puede correlacionar con nuestros resultados de expresión de cFos por estudios inmunohistoquímicos [Muñoz y cols., 2016]. Se ha descrito la activación de *Fos* durante crisis hipocampales espontáneas en un modelo de epilepsia del lóbulo temporal en el ratón C57BL/6 [Edward, 2006], DBA/2J [Kadiyala y cols., 2015], en el transgénico *Kcna1*-null -carentes de canales *Kv1.1*- [Gautier y Glasscock, 2015] y en la rata NER [Harada y cols., 2013].

Parece probado de forma amplia el papel de *Fos* en todo tipo de epilepsias y en una gran variedad de modelos animales, lo que supone que los datos aquí obtenidos refuerzan este conocimiento ya establecido. Por otro lado, también se ha estudiado la evolución de los niveles de *Fos* en el cerebro de ratas, junto con los de *c-jun*, *JunB*, *fra-1* y *fra-2* [Beer y cols., 1998]. Precisamente,

JunB es otro de los genes sobre-expresados dentro de la ruta del receptor de GnRH. También sobre-expresado, se encuentra citado varias veces más en la literatura acompañado de *Fos*, ya sea en estudios que apuntan a que la recuperación de recuerdos después del condicionamiento contextual del miedo resulta en la expresión de ambos en el hipocampo [Strekalova y cols., 2003]; en los que apuntan a que el factor neurotrófico derivado del cerebro restaura la expresión de sus factores de transcripción en el cerebro de rata después de repetidas crisis electroconvulsivas [Hsieh y cols., 1998]; o, en otro estudio sobre factores de transcripción inducibles y constitutivos en el sistema nervioso de los mamíferos y el control de expresión génica a través de *Jun*, *Fos* y *Krox* [Herdegen y Leah, 1998]. Parece claro que, como en el modelo que se presenta en este estudio, *Fos* y *JunB* tienen un nivel de coexpresión elevado. Por lo que hemos visto anteriormente en las redes de interacciones y la aparición en las diferentes categorías de las clasificaciones funcionales, no sólo se podría hablar de esa coexpresión, sino también de la posible inclusión en el grupo de *FosB* y *Fosl2l*, por la fuerte relación entre los 4 genes.

Se ha descrito que *JunB* es un represor de la transcripción de la metaloproteinasa de la matriz MMP-9 en neuronas despolarizadas en el cerebro de ratas [Rylski y cols., 2009] y que el cambio de la composición de la proteína activadora 1 en el hipocampo de ratas después de crisis inducidas por lesiones en el hilio, con la unión de JunB a la proteína activadora 1, subraya el aumento bifásico de la expresión del factor de crecimiento nervioso inducido por las crisis [Elliott y Gall, 2000].

El último gen involucrado en la ruta del receptor de GnRH sería *Vcl*, que codifica la vinculina, proteína implicada en el anclaje de integrina al citoesqueleto celular. El gen también se observó sobre-expresado y, como era de esperar, asociado a la vía de señalización de la integrina (junto con el ya discutido *Cav1*), pero no se conoce en este momento ningún tipo de literatura relevante que apunte a una conexión de *Vcl* con procesos epileptógenos o crisis convulsivas, exceptuando un estudio que señala la

expresión aberrante de proteínas citoesqueléticas, entre las que se encuentra la vinculina, en el hipocampo de pacientes que sufren epilepsia del lóbulo temporal mesial [Yang y cols., 2006]. Es destacable el hecho de que la vinculina fue una de las 18 proteínas que aparece significativamente elevada tras los procesos epilépticos en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal [Yang y cols., 2006], tal y como ocurre el modelo de GASH:Sal.

Cd163, que codifica una proteína marcadora de la activación de monocitos y macrófagos, aparece sobre-expresado en diversas patologías del sistema nervioso. Se ha descrito o que repetidas crisis electroconvulsivas incrementan el número de células CD163 y CD4 [Jansson y cols., 2012] o que los niveles de *Cd163* en pacientes con encefalopatía por influenza son considerablemente más elevados que en los que no tenían secuelas neurológicas, siendo los niveles particularmente elevados en casos de muerte [Hasegawa y cols., 2013].

El último de los genes que han aparecido en el análisis de la expresión diferencial en el transcriptoma de GASH:Sal ha sido *Arc*, un gen de expresión temprana que codifica una proteína asociada al citoesqueleto, que se encontró sobre-expresado (con un valor de FC de 2,07) sobre el que hay numerosas publicaciones. De manera muy destacada, se ha observado su aumento en expresión en el hipocampo por epilepsia insular [Zhang y cols., 2010]; se ha probado que la reducción en su expresión en ratones con síndrome de Angelman atenúa las crisis convulsivas [Mandel-Brehm y cols., 2015]; se ha descrito su aumento de expresión (junto con el de *Egr1*) en el hipocampo de ratas con epilepsia provocada por el pentilentetrazol [Szyndler y cols., 2013]; se ha estudiado la disminución de su expresión y la de *Fos* y *Egr1* a largo plazo tras crisis electroconvulsivas [Calais y cols., 2013]; y se cree que *Arc* puede estar asociado con la reorganización sináptica en la sensibilización en ratas que sufren crisis convulsivas [Akiyama y cols., 2008]. Además, se ha señalado la importancia de *Arc* en la plasticidad sináptica y memoria [Fujimoto y cols., 2004; Vazdarjanova y cols., 2006; Plath y cols., 2016]. También se ha demostrado que el receptor GABAB

puede afectar a la memoria y aprendizaje espacial en ratas epilépticas por medio de la regulación de *Arc* [Lan y cols., 2016].

Finalmente, los genes que han aparecido destacados, *Myo15*, *Grin2c*, *Lum*, *Ogn* y *Fosl2* (los dos primeros infra-expresados y los tres últimos sobre-expresados) no aparecen en la literatura pertinente, lo que no implica que carezcan de importancia en los procesos epileptógenos que nos ocupan. Definitivamente, estos genes se tendrán en cuenta en futuros estudios para profundizar en sus posibles papeles.

6.3 Expresión de genes relacionados con procesos epileptógenos.

En el análisis de los genes diferencialmente expresados entre los transcriptomas, también se realizó una búsqueda por los fenotipos asociados de los diferentes genes detectados para poder señalar los que ya se conoce que están relacionados con procesos epileptógenos, pero podían haber quedado fuera del estudio estricto. En la búsqueda usando los términos “*epilepsy*”, “*epilepsies*” y “*seizure*”, se encontraron 167 genes, de los cuales solamente uno coincidía con los obtenidos en el análisis estricto, *Gpr98*. Pareció recomendable, en todo caso, prestar atención a los genes que cumplían alguno de los dos criterios del estudio estricto: el $FC > 2$, por su importante sobre-expresión o infra-expresión; y el $p \leq 0.05$, por la validez que expresa el valor sobre la medida de la expresión. Con estos criterios, los genes de interés son *Depdc5*, *Mbp*, *Glul*, *Actb*, *Il6r*, *C7*, *Plp1* y el ya mencionado *Gpr98*.

Mutaciones en el gen *Depdc5*, sobre-expresado en el transcriptoma, han sido asociadas en numerosos estudios con epilepsia focal [van Kranenburg y cols., 2015; Baulac, 2014; Lal y cols., 2014; Scheffer y cols., 2014; Martin y cols., 2014; Ishida y cols., 2013], epilepsia focal hereditaria [Baulac y cols., 2015; Kaur, 2013; Malpass, 2013; Dibbens y cols., 2013], epilepsia del lóbulo frontal hereditaria nocturna [Picard y cols., 2014], displasia cortical [Scerri y cols., 2015] o, incluso, se centran en este amplio abanico de patologías

asociadas [Poduri, 2014]. También existen estudios que señalan que las mutaciones en este gen no son causa frecuente de epilepsia del lóbulo frontal hereditaria [Striano y cols., 2015]. Además, se ha estudiado la implicación de *Depdc5* en relación al modelo del presente estudio, en epilepsias audiógenas [Bisulli y cols., 2016; Pippucci y cols., 2015]. En uno de ellos, se destaca otro gen que fue detectado en la búsqueda de fenotipos asociados, *Cntnap2*, que codifica la proteína símil 2 asociada a contactina, y cuya ausencia deriva en epilepsia, anormalidades en la migración neuronal y déficits asociados al autismo [Peñagarikano y cols., 2014].

Mbp, gen codificante de la proteína básica de mielina, un gen fuertemente infra-expresado en los datos obtenidos del transcriptoma, ha sido descrito en modelos de epilepsia tanto infra-expresado, como en el modelo de GASH:Sal [Ye y cols., 2013; Staats y cols., 2015; Jensen y cols., 1998], como sobre-expresado [Huang y cols., 2008; Chen y cols., 1996]. Debido a que varios estudios apuntan a que la vaina de mielina es un factor determinante en la epilepsia en el modelo de ratas con epilepsia provocada por el pentilentetrazol [You y cols., 2013; You y cols., 2011], se muestra más probable que la infra-expresión de *Mbp* pueda estar relacionada con las crisis epilépticas.

Glu1, que codifica la glutamina sintetasa, sobre-expresado en nuestro estudio, ha sido relacionado en numerosos estudios con la epilepsia. En ratones DBA/2J, que sufren epilepsia audiógena, se ha encontrado que los inhibidores de la glutamina sintetasa exacerbaban la condición epiléptica [Chung y Johnson, 1984]. Estos hallazgos resultan contrarios al hecho de que se haya encontrado en este estudio la sobre-regulación de *Glu1*, puesto que, si la presencia de inhibidores de glutamina sintetasa empeora la condición, eso quiere decir que una mayor expresión de *Glu1* y codificación de la proteína la mejoraría. No obstante, podemos estar ante variaciones debidas al modelo o, incluso, a una dependencia de los niveles de expresión. En la misma línea, también se ha descrito que la inhibición de glutamina sintetasa en el núcleo central de la amígdala induce crisis recurrentes en un

modelo de rata con epilepsia del lóbulo temporal mesial [Gruenbaum y cols., 2015], así como la reducción de la proteína tras *status epilepticus* en el hipocampo de ratas inmaduras [van der Hel y cols., 2014], e indica que su ausencia o bajo nivel de expresión, es un valioso marcador de epilepsia y mayores posibilidades de supervivencia al glioblastoma multiforme [Rosati y cols., 2013]. Sin embargo, también se ha identificado que el aumento de glutamina sintetasa en astrocitos reactivos mediante inyecciones de pilocarpina empeoraba la evolución de epilepsia en ratas [Sun y cols., 2016] y que su sobre-expresión en el giro dentado está relacionada con procesos epileptógenos en ratas [Sun y cols., 2013]. Existen muchos estudios que relacionan las deficiencias y niveles bajos de glutamina sintetasa con procesos epilépticos [Swamy y cols., 2011; Rosati y cols., 2009; Eid y cols., 2008; van der Hel y cols., 2005; Eid y cols., 2004], sin embargo, puede que la clave de estas discrepancias esté en las medidas de la expresión en las diferentes fases de la epilepsia: se encontró elevado en la fase latente, mientras que disminuía en la crónica en un modelo de kainato de la epilepsia del lóbulo temporal [Hammer y cols., 2008].

En el caso de *Actb*, gen sobre-expresado en nuestro estudio, se han reportado niveles de expresión excesivamente variables como para servir como referencia en un modelo de hipotálamo de rata que sufre crisis febriles [Swijsen y cols., 2012], aunque se consideró estable en un modelo diferente de epilepsia de lóbulo temporal con crisis focales [Pernot y cols., 2010]. Especialmente llamativa es su importancia como causante (por mutación) del síndrome de Baraitser-Winter que puede manifestar pérdida de audición, crisis y disfunción muscular, entre otras patologías [Kemerley y cols., 2016].

Se ha observado la relación de la variación de *Il6r*, y otros genes relacionados con la inflamación, con la susceptibilidad a convulsiones febriles infantiles [Emsley y cols., 2014] y con el desarrollo de crisis tras infecciones virales [Libbey y cols., 2011]. Se ha sugerido que minimiza las consecuencias de episodios excitotóxicos en la función cerebral amplificando

la señalización adenosinérgica endógena [Biber y cols., 2008] y se ha medido un incremento de la concentración de interleucina 6 después de crisis tónico-clónicas que provoca procesos inflamatorios [Peltola y cols., 2000]. Los receptores para estas citocinas se sobrerregulan rápidamente en grupos de neuronas durante el proceso convulsivo, lo que sugiere que el efecto de las citocinas está mediando sobre la excitabilidad neuronal al exacerbar la expresión de receptores AMPA y de esta manera mediar el proceso de excitotoxicidad, dependiendo de sus concentraciones extracelulares y del tiempo que ha sido expuesto el tejido a estas citocinas a lo largo de todo el proceso de daño [Vezzani y Granata, 2005].

A parte de lo ya mencionado sobre *C7* cuando se habló de *C6*, este gen infraexpresado en el modelo GASH:Sal, se ha relacionado con crisis electroencefalográficas, neurodegeneración y citotoxicidad [Xiong y cols., 2003].

Plp1 ha sido relacionado con una variedad de desórdenes, incluidas crisis convulsivas [Hobson y Kamholz, 2013] y se ha estudiado en sujetos que habían sufrido epilepsia del lóbulo temporal durante al menos 10 años, sobre-expresándose entre los grupos de muestra [Arion y cols., 2006], antes y después de realizar una lobectomía parcial.

Para terminar, un gen en el que parece interesante detenerse sería *Gpr98*, codificante del receptor acoplado a proteínas G98, también conocido como *Adgrv1*, *Mass1*, o *VLGR1*, debido a que es el único gen que aparece tanto en el estudio estricto de expresión diferencial de los transcriptomas, como en el de búsquedas en los fenotipos asociados, apareciendo infraexpresado en el CI del GASH:Sal en relación al control (FC = -2,27; $p = 0,011$). Codifica una proteína G acoplada al receptor 98 llamada *vlgr1*. Se localiza en la unión extracelular entre diferentes estereocilios y también entre membranas ciliares [Maerker y cols., 2008]. El gen está asociado a procesos biológicos como la percepción sensorial del sonido, organización de estereocilios del oído interno o desarrollo del sistema nervioso central [Klein y cols., 2005]. El hecho de que se presente infra-expresado tras estimulación auditiva puede

indicar algún tipo de cortocircuito sensorial debido a las crisis audiógenas. *Gpr98* ha sido vinculado a epilepsia en modelos audiógenos de ratón [Skradski y cols., 2001; McMillan y White, 2004], susceptibilidad a epilepsia audiógena y sordera [Yagi y cols., 2009; Yagi y cols., 2005], déficits auditivos [Klein y cols., 2005] y ha sido relacionado con LGI1 en contextos epilépticos [Scheel y cols., 2002]. Los estudios disponibles en estos momentos parecen establecer una relación directa entre la proteína codificada por este gen y la epilepsia y crisis audiógenas, además de con el síndrome de Usher [Moteki y cols., 2015; Yang y cols., 2016], que causa pérdida de audición y vista y crisis febriles. También existen investigaciones que descartan que la mutación del gen esté relacionada con epilepsia y crisis febriles [Deprez y cols., 2006], pero se trata de un caso muy concreto y, realmente, la excepción a la hora de situar *Gpr98* en el centro de atención en lo que se refiere a procesos epilépticos y, más relevante para este estudio, epilepsias audiógenas.

6.4 Sobreexpresión de los genes de expresión temprana *Egr1*, *Egr2* y *Egr3* en dos líneas de roedores con epilepsia audiógena.

Para confirmar mediante RT-qPCR los genes desregulados en el CI tras la crisis epiléptica, hemos elegido inicialmente aquéllos descritos en la bibliografía que están sobre-expresados en el foco epiléptico durante las crisis y en los periodos interictales. La expresión de estos genes, entre los que se encuentran los factores de transcripción *Egr1* y *Egr2*, no depende de la frecuencia de las crisis, y contribuyen a desarrollar y mantener la hiperactividad anormal existente en los focos epilépticos [Rakhade y cols., 2005].

Parte de estos resultados presentados en el presente apartado, así como los desarrollados en los apartados 5.5 y 5.6, son derivados de la publicación previa [López-López y cols., 2016] en la revista especializada de epilepsia,

Epilepsy & Behavior, que se puede encontrar en el Anexo 6 del presente trabajo.

La comparación de los perfiles de expresión génica entre dos modelos animales (GASH:Sal y WAR) usando datos obtenidos de microarrays [López-López y cols., 2016], mostró un gen en común, *Egr3*, que se observó sobre-expresado en ambos casos. Por otro lado, usando estudios de RT-qPCR, se confirmó que la expresión diferencial en relación a los respectivos controles de este gen y otros dos genes de la misma familia, *Egr1* y *Egr2*, se presentan sobre-expresados en ambas especies. Las discrepancias entre ambos experimentos pudieron ocurrir por diversas razones, incluido el hecho de que se usan diferentes sondas en los dos experimentos, diferencias en los métodos de normalización de los datos de expresión obtenidos, o la aparición de un falso positivo en los cambios de expresión. Además, la baja correlación entre los resultados del análisis de RT-qPCR y los resultados obtenidos en los microarrays [López-López y cols., 2016] han sido señalados consistentemente para genes que presentan variaciones de bajo grado [Morey y cols., 2006].

Los genes *Egr1*, *Egr2*, y *Egr3*, son genes de respuesta temprana-inmediata, lo que se refiere a aquellos cuya transcripción puede ser inducida de forma rápida y temporal por una amplia variedad de estímulos celulares, desde ambientales a fisiológicos pasando por patológicos [Beckmann y Wilce, 1997; Patwardhan y cols., 1991]. Estos genes codifican la familia EGR de proteínas que contienen dedos de zinc, que se unen a ADN, ARN o proteínas [Crosby y cols., 1991; O'Donovan y cols., 1992].

Los factores que inducen la expresión de estos genes en células de animales mamíferos, incluyen el estrés [Senba y Ueyama, 1997], que pueden ser inducidos por estresores externos, químicos y físicos [Ronkina y cols., 2011] o internos, como estrés cardiaco [Shieh y cols., 2011], que eleva el nivel de *Egr* en el ARNm. El aumento de la transcripción de *Egr* debido a estrés, ocurre en tejidos tan variados como las glándulas adrenales [Honkaniemi y cols., 2011] y el hipocampo. Es interesante señalar que se ha descrito que

Egr1 tiene un rol claro como intermediario en la expresión génica requerida para algunos procesos de aprendizaje y memoria [Abraham y cols., 1991, Worley y cols., 1993], mientras que *Egr3* está asociado con la plasticidad neuronal que aparece en respuesta a estrés y novedad [Gallitano-Mendel y cols., 2007]. Igualmente, se ha señalado un vínculo entre *Egr1*, *Egr3* y *Arc* (un gen que también aparece en el estudio estricto de los genes diferencialmente expresados en el transcriptoma, como ya se ha comentado anteriormente), ya que las proteínas expresadas por el último, están directamente reguladas por *Egr1* y *Egr3*, lo que puede modular la plasticidad sináptica regulando directamente *Arc* [Li y cols., 2005].

Los genes de expresión temprana *Egr1*, *Egr2*, y *Egr3* también están involucrados en la adaptación a estímulos nuevos [Poirier y cols., 2008], lo que, aplicado a nuestro estudio, explicaría su presencia en los núcleos cocleares, donde las células responden al sonido. La exposición a novedad puede provocar depresión crónica y *Egr3* ha sido asociado con procesos relacionados con este tipo de enfermedad [Gallitano-Mendel y cols., 2007], en los que también interviene *Srf* [Lindecke y cols., 2006], un gen que se encontró sobre-expresado en el transcriptoma de GASH:Sal (con un FC de 1,96).

También se ha observado que ratones en los que se ha producido el bloqueo de *Egr3* muestran una adaptación anormal al estrés y novedad, déficits en la adaptación al sobresalto y en la plasticidad sináptica [Gallitano-Mendel y cols., 2007]. Mediante inmunquímica, se detectó esta proteína en el hipocampo de WAR y GASH:Sal, tanto en los animales que estaban sujetos a la estimulación auditiva como en los que no [López-López y cols., 2016].

Varios procesos que contribuyen a la hiperexcitabilidad neuronal, como la producida por el síndrome de abstinencia de etanol [Beckmann y cols., 1997] o crisis convulsivas provocadas [Honkaniemi y Sharp, 1999], tuvieron como resultado la sobre-expresión de los genes *Egr*. También está observado que, tras ataques inducidos por el ácido kaínico, se observa el patrón de expresión de este tipo de genes, especialmente en el hipocampo, la corteza y

la amígdala [Honkaniemi y Sharp, 1999] y que la expresión de *Egr3* se incrementa en el hipocampo de humanos con epilepsia del lóbulo temporal, así como en modelos animales del mismo tipo de epilepsia [Roberts y cols., 2006]. Sin embargo, en las ratas *Lgi1L385R/+*, que desarrollan convulsiones tónico-clónicas generalizadas en respuesta a estímulos auditivos, se ha observado la infra-expresión de *Egr2* después de la estimulación [Fumoto y cols., 2014]. En el caso de humanos, se ha podido observar un patrón común de activación génica persistente en centros de epilepsia neocortical en el caso de *Egr1* y *Egr2* [Rakhade y cols., 2005], pero no en el de *Egr3*. Por lo que se ha podido investigar, ahora mismo no existe información acerca de la sobre-expresión de estos genes o el incremento de las proteínas correspondientes en el CI después de crisis audiógenas en modelos animales. Una expresión sostenida de estos genes puede representar una respuesta al estrés por la que las neuronas tratan de protegerse, o bien un indicio de que las células están iniciando una ruta hacia una muerte celular programada o apoptosis. En el caso que nos ocupa, la sobre-expresión de *Egr3* tras la estimulación, tanto en el caso del modelo WAR como en el de GASH:Sal, podría explicarse por el rol fundamental de *Egr3* en la regulación de la expresión génica que promueve la homeostasis en la inervación motora del huso neuromuscular [Fenandes y Tourtellotte, 2015], que cambia con el incremento de la actividad motora, tal y como se ha observado en acontecimientos ictales. También ha sido dado a conocer recientemente, sin alejarse demasiado de lo anterior, que *Egr3* es el objetivo de fundamentales vías de señalización mediadas por la cocaína, responsables por la inducción de actividad locomotora [Chandra y cols., 2015].

El gen de respuesta a crecimiento temprano-3 ha sido asociado con cambios en la expresión de *GABRa4* después de *status epilepticus* [Grabenstatter y cols., 2012]. Este gen codifica una subunidad del receptor de GABA, un canal iónico intermediario en la mayoría de la inhibición en el sistema nervioso central. La sobre-expresión transcripcional de la subunidad $\alpha 4$ (*GABRa4*) de este receptor provocada por crisis convulsivas [Roberts y cols.,

2005] puede jugar un papel importante en la etiología de la epilepsia del lóbulo temporal [Roberts y cols., 2005]. En el presente estudio hemos encontrado esta correlación únicamente en el CI de WAR, que mostró una sobre-expresión de *GABRA4* después del acontecimiento ictal, pero no en el caso de GASH:Sal. Esto último también se pudo observar en los datos obtenidos del transcriptoma, donde el gen se mostró infra-expresado (con un FC de -1,187). Es posible que en el caso de GASH:Sal, los mecanismos excitotóxicos no tuvieran relación con la modificación en la expresión de la subunidad $\alpha 4$ del receptor de GABA, sino con las modificaciones en la expresión de otras subunidades de este receptor ($\beta 2$), lo que resultaría en su disfunción [Prieto-Martín y cols., 2015].

Algo que también se puede atribuir al grupo de genes *Egr*, concretamente al *Egr3*, es el hecho de que tiene un papel esencial en la conversión de señales mitogénicas, a través del factor de crecimiento epidérmico, en una respuesta proliferativa para regular la morfología de las dendritas de neuronas del sistema nervioso simpático y las ramificaciones terminales de los axones; procesos fundamentales para el desarrollo normal del sistema nervioso simpático [Quach y cols., 2013]. Además, junto con *Egr2*, *Egr3* realiza funciones esenciales en la mielinización del sistema nervioso periférico [Tourtellotte y Milbrandt, 1998].

Estos genes (*Egr2* y *Egr3*) están involucrados también en el control de la inflamación [Grabenstatter y cols., 2012] y en la proliferación de linfocitos B y T [Sumitomo y cols., 2013; Lazarevic y cols., 2009]. Además, se detectó inmunorreactividad para la proteína Egr3 en células de linfomas de Burkitt neoplásicos de tipo no Hodgkin, que se habían observado anteriormente en GASH:Sal y en linfomas de Burkitt de tipo B en humanos. *Egr3* también se encuentra altamente sobre-expresado en otros tipos de cáncer, como el de próstata [Pio y cols., 2013] o el de mama [Inoue y cols., 2004]. Esta relación entre *Egr3* y el cáncer no se ha observado en otros miembros de la familia *Egr*, para los que, incluso, se describió exactamente lo contrario. Un ejemplo sería el señalado por numerosos estudios que detallan las funciones

supresoras de *Egr1* en este aspecto y su infra-regulación en cáncer de mama, pulmón y gliomas [Levin y cols., 1994; Huang y cols., 1995; Calogero y cols., 2001]. Dada la estrecha relación de *Egr3* con estas enfermedades, se prevé realizar nuevas investigaciones para intentar determinar si *Egr3* puede ser útil como marcador predictivo de linfomas y otros tipos de cáncer. Se concluye, por lo tanto, que la actividad inter-ictal en epilepsia neocortical humana está asociada de manera intrínseca con la expresión de un grupo de factores de transcripción dependientes de actividad. Como no se ha encontrado suficiente relación entre expresión génica y la frecuencia de las crisis convulsivas, los resultados que aquí se presentan parecen apuntar a que la actividad inter-ictal posee una gran influencia en los cambios dependientes de actividad en genes y puede participar en el desarrollo y mantenimiento de la hiperactividad neuronal anormal que se encuentra en la epilepsia neocortical humana [Rakhade y cols., 2007].

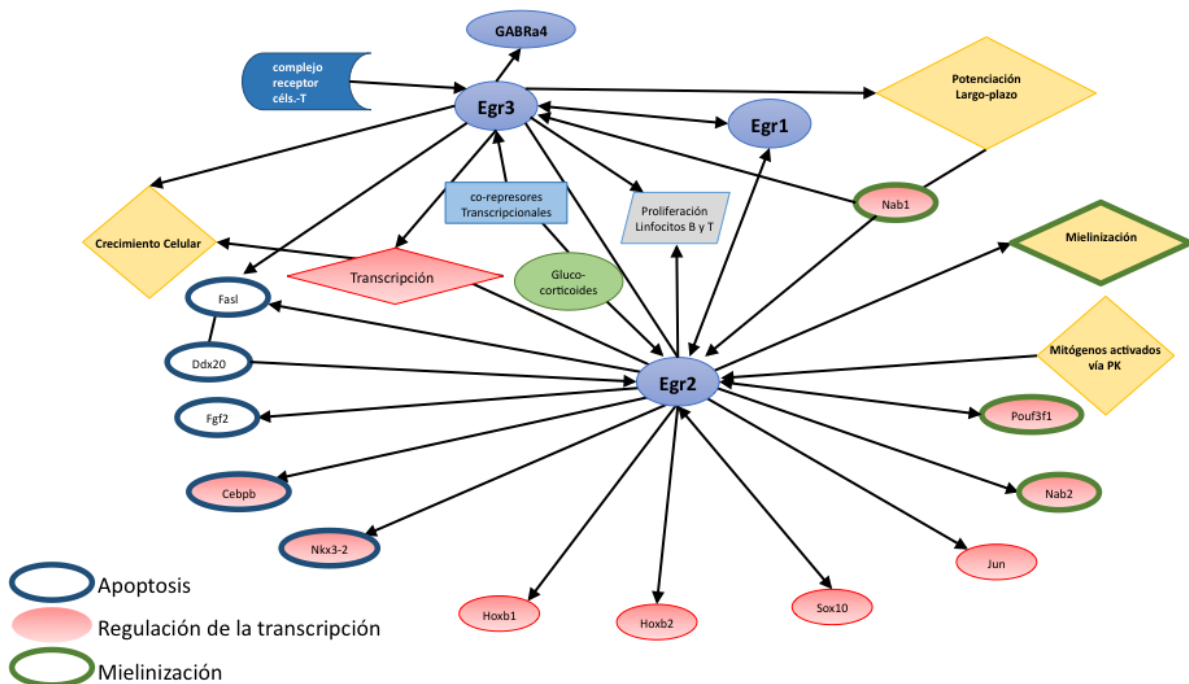


Figura 27. Esquema que resume la relación entre los genes *Egr* y su asociación con procesos de crecimiento celular, apoptosis, depresión crónica, mielinización, señalización de corticoesteroides y genes de regulación de transcripción. Las conexiones indican que las proteínas *Egr* actúan como efectores nucleares de varias señales.

En el análisis escrito de los genes diferencialmente expresados en el transcriptoma realizado anteriormente (en el cual estaban incluidos los tres genes de la familia *Egr* que nos ocupan), se observó no sólo su importante sobre-expresión (*Egr1* con un FC de 3,53, *Egr2* con 18,67 y *Egr3* con 5,41), especialmente la de *Egr2*, pero también se pudo observar estos genes dentro de un fuerte núcleo de interacciones con varios de los genes analizados (Fig. 28), algunos de ellos, como se ha discutido ya, con interés dentro del estudio. En resumen, el estudio de la expresión de genes en los núcleos que generan las crisis epilépticas en diferentes modelos animales y en diferentes focos epileptógenos, nos permiten buscar un nexo común en esta enfermedad, de otro modo, “heterogénea”, con importancia potencial para futuras aproximaciones diagnósticas y terapéuticas en la epilepsia humana.

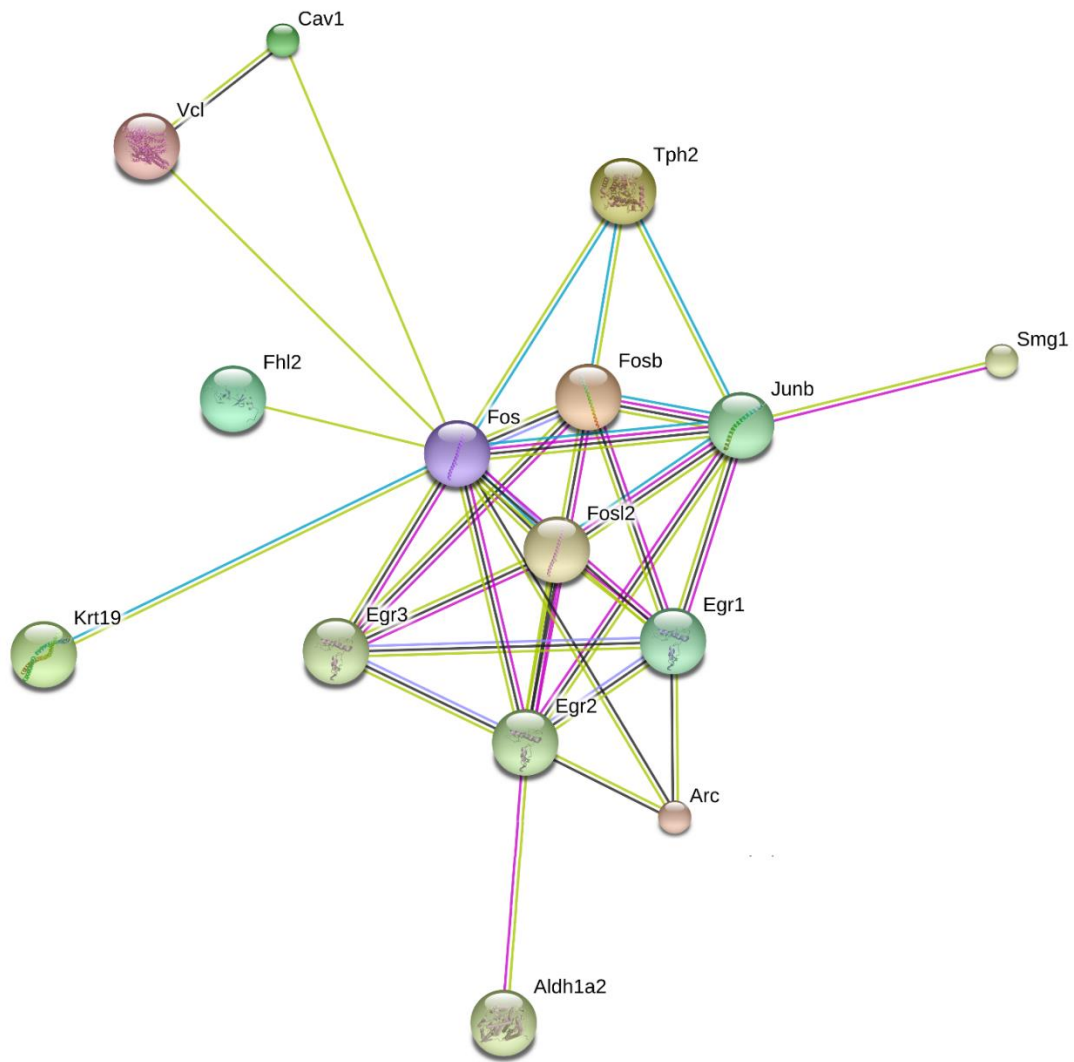
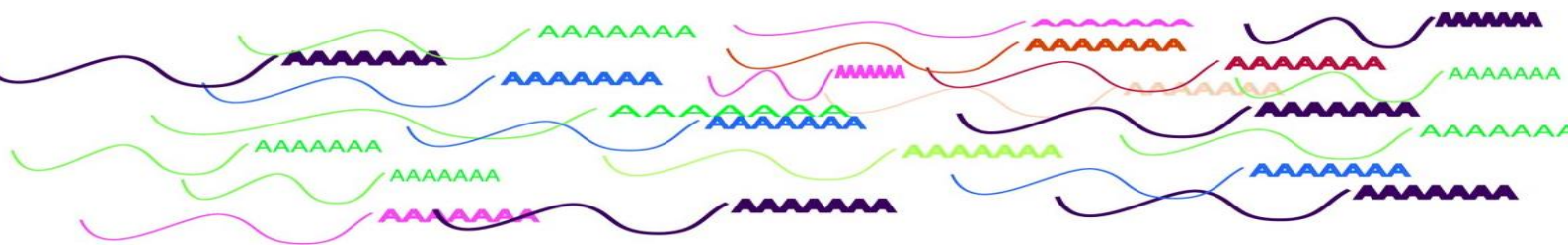


Figura 28. Detalle de la red de interacciones entre las proteínas de los genes del estudio estricto del transcriptoma. Se observa la relación entre los genes de la familia *Egr* y otros como *Fosl2*, *Fos*, *FosB*, *JunB*, *Aldh1a2* y *Arc*, cuya relación ya se ha señalado anteriormente. Las líneas representan las diferentes interacciones encontradas en la base de datos de STRING: de bases de datos organizadas (azul claro), determinadas experimentalmente (magenta), proximidad (verde), co-ocurrencia (azul oscuro), fusiones (rojo), búsquedas bibliográficas (amarillo), co-expresión (negro) y homología de proteínas (gris).



7. CONCLUSIONES

PRIMERA

Se ha descrito el transcriptoma del núcleo desencadenante de las crisis epilépticas en el hámster GASH:Sal y anotados los genes. Tras la estimulación sonora, el análisis del transcriptoma en el colículo inferior del GASH:Sal por comparación con sondas de *Cricetulus griseus*, se pudieron detectar 102.277 genes expresados diferencialmente, de los que se pudieron identificar 86.695 en la anotación.

SEGUNDA

Las crisis convulsivas audiogénicas en animales susceptibles causan desregulación génica en el núcleo origen de las crisis. El análisis comparativo entre los genes expresados en el colículo inferior del hámster control y el GASH:Sal muestra 58 genes diferencialmente expresados. Estos genes presentan un elevado número de interacciones entre ellos, lo que indica que deben estar, al menos de forma parcial, conectados biológicamente.

TERCERA

Las categorías funcionales con más genes representados son las de genes que codifican proteínas transportadoras (cationes y de canales iónicos), receptores (fundamentalmente acoplados a proteínas G), factores de transcripción y proteínas del citoesqueleto. También se detectan genes de respuesta a estímulos o implicados en procesos apoptóticos.

CUARTA

Tras las crisis convulsivas audiógenas, los genes *FosB*, *JunB*, *Fos*, *Vcl* están sobre-expresados en el colículo inferior de la línea de hámsteres GASH:Sal en comparación a los controles, a diferencia del *Cav1*, que presenta una menor expresión. Estos genes están implicados en la vía del receptor de GnRH, que ya ha sido relacionado con procesos epilépticos.

QUINTA

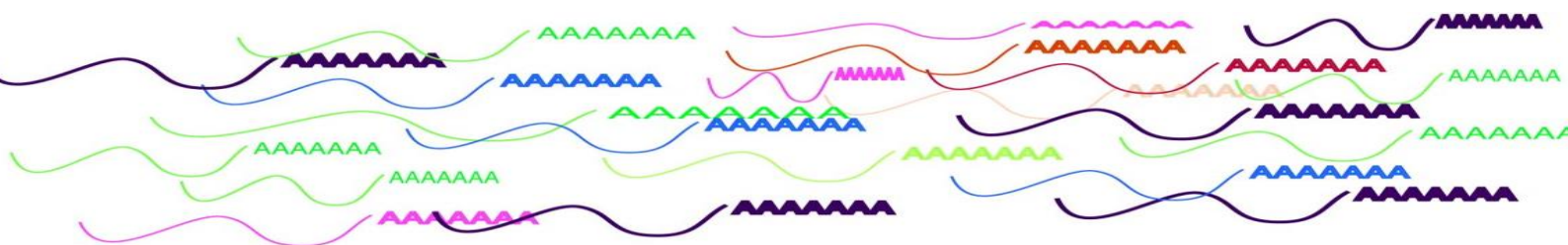
El gen *Gpr98*, *Mass1* o *Vlgr1*, tiene una baja tasa de expresión en el transcriptoma del colículo inferior tras las crisis epilépticas. Este gen codifica una proteína crucial en los fenómenos de transducción sensorial, auditiva y visual, lo que pudiera explicar las deficiencias auditivas descritas en el modelo GASH:Sal.

SEXTA

Los animales con susceptibilidad audiógena WAR y GASH:Sal mostraron sobreexpresión de los genes de respuesta temprana de crecimiento *Egr1*, *Egr2*, y *Egr3*, presumiblemente como un efecto del estrés asociado a las convulsiones. La sobreexpresión de estos genes fue mayor en el modelo WAR que en el GASH:Sal. Estos genes son factores de transcripción, y su activación precede a más respuestas transcripcionales relacionadas con procesos de mielinización, crecimiento celular, apoptosis, LTD y activación de genes reguladores de la transcripción.

SÉPTIMA

El estudio del transcriptoma en el núcleo origen de las crisis describe múltiples interrelaciones génicas y posiblemente proteicas, que pueden influir en el desencadenamiento de las crisis convulsivas audiógenas en el modelo GASH:Sal y permite buscar un nexo común en esta enfermedad, de otro modo, “heterogénea”, con importancia potencial para futuras aproximaciones diagnósticas y terapéuticas en la epilepsia humana.



8. BIBLIOGRAFÍA

1. Abraham WC, Dragunow M, Tate WP. The role of immediate early genes in the stabilization of long-term potentiation. *Mol Neurobiol.* 1991; 5:297–314.
2. Adams J. Transcriptome: connecting the genome to gene function. *Nature Education* 2008; 1(1):195.
3. Akiyama K, Ishikawa M, Saito A. mRNA expression of activity-regulated cytoskeleton-associated protein (*arc*) in the amygdala-kindled rats. *Brain Res.* 2008; 1189:236-246.
4. Amado D, Cavaleiro EA, Bentivoglio M. Epilepsy and hormonal regulation: the patterns of GnRH and galanin immunoreactivity in the hypothalamus of epileptic female rats. *Epilepsy Res.* 1993; 14(2):149-159.
5. Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 2004; 64(15):5245–50.
6. Arion D, Sabatini M, Unger T, Pastor J, Alonso-Nanclares L, Ballesteros-Yáñez I, García Sola R, Muñoz A, Mirnics K, DeFelipe J. Correlation of transcriptome profile with electrical activity in temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis.* 2006; 22(2):374-387.
7. 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.
8. Avoli M. A brief history on the oscillating roles of thalamus and cortex in absence seizures. *Epilepsia.* 2012;53(5):779–789.
9. Babraham institute. Babraham bioinformatics.
<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
10. Banda NK, Hyatt S, Antonioli AH, White JT, Glogowska M, Takahashi K, Merkel TJ, Stahl GL, Mueller-Ortiz S, Wetsel R, Arend WP, Holers VM. Role of C3a receptors, C5a receptors, and complement protein C6 deficiency in collagen antibody-induced arthritis in mice. *J Immunol.* 2012; 188(3):1469-1478.
11. Barrera-Bailón B, Oliveira JAC, López DE, Muñoz de la Pascua LJ, Garcia-Cairasco N, Sancho C. Pharmacological and neuroethological study of three antiepileptic drugs in the genetic audiogenic seizure hamster (GASH:Sal). *Epilepsy and Behavior* 2013; 28(3):413-425.
12. Barrera-Bailón B, Oliveira JAC, López DE, Muñoz LJ, Garcia-Cairasco N, Sancho C. Pharmacological validation of the genetic audiogenic seizure hamster (GASH:Sal) using several antiepileptics. *Epilepsy Behav.* 2016; (online). doi: [10.1016/j.yebeh.2015.11.005](https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.11.005)
13. Basic Local Alignment Search Tool. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

14. Baulac S. Genetics advances in autosomal dominant focal epilepsies: focus on DEPDC5. *Prog Brain Res.* 2014; 213:123-139.
15. Baulac S, Ishida S, Marsan E, Miquel C, Biraben A, et al. Familial focal epilepsy with focal cortical dysplasia due to DEPDC5 mutations. *Ann Neurol.* 2015; 77(4):675-683.
16. Becker AJ, Chen J, Zien A, Sochivko D, Normann S, Schramm J, et al. Correlated stage- and subfield-associated hippocampal gene expression patterns in experimental and human temporal lobe epilepsy. *Eur J Neurosci.* 2003; 18:2792–2802.
17. Beckmann AM, Matsumoto I, Wilce PA. AP-1 and Egr ADN-binding activities are increased in rat brain during ethanol withdrawal. *J Neurochem.* 1997; 69(I):306–314.
18. Beckmann MA, Wilce PA. Egr transcription factors in the nervous system. *Neurochem Int.* 1997; 31:477–510.
19. Beer J, Mielke K, Zipp M, Zimmermann M, Herdegen T. Expression of c-jun, junB, c-fos, fra-1 and fra-2 mRNA in the rat brain following seizure activity and axotomy. *Brain Res.* 1998; 794(2):255-266.
20. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*1995; 57(1): 289-300.
21. Beraldo H. Semicarbazonas e Tiossemicarbazonas: o amplo perfil farmacológico e usos clínicos. *Química Nova* 2004, 27(3):461-471.
22. Berkovic SF, Scheffer IE. Epilepsies with single gene inheritance. *Brain Dev.* 1997; 19(1): 13-18.
23. Bhutia YD., Hung SW., Patel B., Lovin D., Govindarajan R. CNT1 expression influences proliferation and chemosensitivity in drug-resistant pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* 2011; 71(5):1825-1835.
24. Biber K, Pinto-Duarte A, Wittendorp MC, Dolga AM, Fernandes CC, *et al.* Interleukin-6 upregulates neuronal adenosine A1 receptors: implications for neuromodulation and neuroprotection. *Neuropsychopharmacology* 2008; 33(9):2237-2250.
25. Bioconductor, Differential gene expression analysis based on the negative binomial distribution. <http://bioconductor.org/packages/2.12/bioc/html/DESeq.html>
26. Bioconductor, Exploratory Data Analysis and Normalization for RNA-Seq. <http://bioconductor.org/packages/2.12/bioc/html/EDASeq.html>
27. Bisulli F, Licchetta L, Baldassari S, Pippucci T., Tinuper P. DEPDC5 mutations in epilepsy with auditory features. *Epilepsia* 2016; 57(2):335.
28. Blevins G, Macaulay R, Harder S, Fladeland D, Yamashita T, *et al.* Oculoleptomeningeal amyloidosis in a large kindred with a new transthyretin variant Tyr69His. *Neurology* 2003; 60(10):1625-1630.

29. Brett M, Persey MR, Reilly MM, Revesz T, Booth DR, Booth SE, Hawkins PN, Pepys MB, Morgan-Hughes JA. Transthyretin Leu12Pro is associated with systemic, neuropathic and leptomeningeal amyloidosis. *Brain* 1999; 122 (Pt 2):183-190.
30. Browning RA. Neuroanatomical localization of structures responsible for seizures in the GEPR: lesion studies. *Life Sci* 1986; 8:39(10):857-67.
31. Burgess DL, Jones JM, Meisler MH, Noebels JL. Mutation of the Ca²⁺ channel beta subunit gene *Cchb4* is associated with ataxia and seizures in the lethargic (lh) mouse. *Cell* 1997; 88(3):385-392.
32. Calais JB., Valvassori SS., Resende WR., Feier G., Athié MC., Ribeiro S., Gattaz WF., Quevedo J., Ojopi EB. (2013). Long-term decrease in immediate early gene expression after electroconvulsive seizures. *J Neural Transm (Vienna)*. 2013 Feb;120(2):259-66. doi: 10.1007/s00702-012-0861-4.
33. Calogero A, Arcella A., De Gregorio G, Porcellini A, Mercola D, et al. The early growth response gene *EGR-1* behaves as a suppressor gene that is down-regulated independent of ARF/Mdm2 but not p53 alterations in fresh human gliomas. *Clin Cancer Res* 2001; 7:2788–2796.
34. Carballosa González, M. (2008). Hacia un nuevo modelo de epilepsia: el hámster GASH:Sal. Tesis Universidad de Salamanca. <http://hdl.handle.net/10366/55970>
35. Carballosa-Gonzalez MM, Muñoz LJ, López-Alburquerque T, Pardal-Fernández MJ, Nava E, de Cabo C, Sancho C, López DE. EEG characterization of audiogenic seizures in the hamster strain GASH:Sal. *Epilepsy Research* 2013; 106:318-325.
36. Carrera-Marín A, Romay-Penabad Z, Papalardo E, Reyes-Maldonado E., García-Latorre E., Vargas G, Shilagard T, Pierangeli S. C6 knock-out mice are protected from thrombophilia mediated by antiphospholipid antibodies. *Lupus* 2012; 21(14):1497-1505.
37. Carvalho LED. Participação dos receptores GABAA no potencial excitatório pós-sináptico em hipocampo e amígdala de ratos wistar audiogênicos (WAR). Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós- Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. 2007.
38. Chang TW. Binding of cells to matrixes of distinct antibodies coated on solid surface. *Journal of Immunological Methods* 1983; 65 (1–2): 217-223.
39. Chandra R, Francis TC, Konkalmatt P, Amgalan A, Gancarz AM, *et al.* (2015). Opposing role for *Egr3* in nucleus accumbens cell subtypes in cocaine action. *J Neurosci*. 2015; 35(20):7927–7937.
40. Chen J, Wang X, Zhou S, Wang R, Zhang Y, Li C, Zhou D. The serum MBP, myelin sheath immunohistochemistry and electromicroscope of experimental epilepsy rats. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 1996; 27(3):236-239.

41. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156-9.
42. Chung SH, Johnson MS. Studies on sound-induced epilepsy in mice. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1984; 221(1223):145-168.
43. Claverie JM. Fewer genes, more noncoding RNA. *Science* 2005; 309:1529-1530
44. Contreras-Leal E, Hernández-Oliveras A, Flores-Peredo L, Zarain-Herzberg Á, Santiago-García J. Histone deacetylase inhibitors promote the expression of ATP2A3 gene in breast cancer cell lines. *Mol Carcinog.* 2015; Sep 1. doi: 10.1002/mc.22402.
45. Coulter DA. Epilepsy-associated plasticity in gammaaminobutyric acid receptor expression, function, and inhibitory synaptic properties. *Int Rev Neurobiol.* 2001;45:237–252.
46. Crosby SD, Puetz JJ, Simburger KS, Fahrner TJ, Milbrandt J. The early response gene NGFI-C encodes a zinc finger transcriptional activator and is a member of the GCGGGGGCG (GSG) element-binding protein family. *Mol Cell Biol* 1991; 11:3835-3841.
47. Curia G, Gualtieri F, Bartolomeo R, Vezzali R, Biagini G. Resilience to audiogenic seizures is associated with p-ERK1/2 dephosphorylation in the subiculum of *Fmr1* knockout mice. *Front Cell Neurosci.* 2013; 7:46.
48. Dailey JW, Jobe PC. Anticonvulsant drugs and the genetically epilepsy-prone rat. *Federation Proceedings* 1985, 44(10):2640-2644.
49. Danecek P, Auton A, Abecasis G, Albers CA, Banks E, *et al.* The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics.* 2011; 27(15):2156-2158.
50. 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.
51. Deprez L, Claes LR, Claeys KG, Audenaert D, Van Dyck T, *et al.* Genome-wide linkage of febrile seizures and epilepsy to the FEB4 locus at 5q14.3-q23.1 and no MASS1 mutation. *Hum Genet.* 2006; 118(5):618-625.
52. Dibbens LM, de Vries B, Donatello S, Heron SE, Hodgson BL, *et al.* Mutations in DEPDC5 cause familial focal epilepsy with variable foci. *Nat Genet.* 2013; 45(5):546-451.
53. Doretto M.C., Fonseca C.G., Lobo R.B., Terra V.C., Oliveira J.A.C. Garcia- Cairasco N. Quantitative study of the response to genetic selection of the Wistar Audiogenic Rat strain (WARS). *Behavior Genetics* 2003, 33:33-42.
54. Doretto MC, Garcia-Cairasco N, Pimenta NJ, Souza DA, Tatsuo MA. Dipyrone, a novel anticonvulsant agent? Insights from three experimental epilepsy models. *Neuroreport* 1998, 9(10):2415-2421.
55. Dudek FE. Activation of Fos During Spontaneous Hippocampal Seizures in a Model of Temporal Lobe Epilepsy. *Epilepsy Curr.* 2006; 6(2):57–58.

56. Eid T, Ghosh A, Wang Y, Beckström H, Zaveri HP, *et al*. Recurrent seizures and brain pathology after inhibition of glutamine synthetase in the hippocampus in rats. *Brain*. 2008; 131(Pt8):2061-2070.
57. Eid T, Thomas MJ, Spencer DD, Rundén-Pran E, Lai JC, *et al*. Loss of glutamine synthetase in the human epileptogenic hippocampus: possible mechanism for raised extracellular glutamate in mesial temporal lobe epilepsy. *Lancet* 2004; 363(9402):28-37.
58. Elliott RC, Gall CM. Changes in activating protein 1 (AP-1) composition correspond with the biphasic profile of nerve growth factor mRNA expression in rat hippocampus after hilus lesion-induced seizures. *J Neurosci*. 2000; 20(6):2142-219.
59. Embury SH, Scharf SJ, Saiki RK, Gholson MA, Golbus M, *et al*. Rapid prenatal diagnosis of sickle cell anemia by a new method of DNA analysis. *New Engl. J. Med*. 1987; 316(11):656-661
60. Emsley HC, Appleton RE, Whitmore CL, Jury F, Lamb JA, *et al*. Variations in inflammation-related genes may be associated with childhood febrile seizure susceptibility. *Seizure* 2014; 23(6):457-61.
61. Enomoto S, Shimizu K, Nibuya M, Toda H, Yoshino A, *et al*. Increased expression of endocytosis-Related proteins in rat hippocampus following 10-day electroconvulsive seizure treatment. *Neurosci Lett*. 2016; 624:85-91.
62. EpiPM Consortium, A roadmap for precision medicine in the epilepsies. 2015; DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00199-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00199-4).
63. Estrada IA, Donthamsetty R, Debski P, Zhou MH, Zhang SL, *et al*. STIM1 restores coronary endothelial function in type 1 diabetic mice. *Circ Res*. 2012; 111(9):1166-1175.
64. Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res*. 1998; 8(3):175-185.
65. Faingold CL. Emergent properties of CNS neuronal networks as targets for pharmacology: application to anticonvulsant drug action. *Prog Neurobiol*. 2004; 72(1):55-85.
66. Faingold CL, Marcinczyk MJ, Casebeer DJ, Randall ME, Arnerić SP, Browning RA, *et al*. GABA in the inferior colliculus plays a critical role in control of audiogenic seizures. *Brain Res*. 1994; 640(1-2):40-47.
67. Fawley JA, Pouliot WA, Dudek FE. Epilepsy and reproductive disorders: the role of the gonadotropin-releasing hormone network. *Epilepsy Behav*. 2006; 8(3):477-482.
68. Fawley JA, Pouliot WA, Dudek FE. Pilocarpine-induced status epilepticus and subsequent spontaneous seizures: lack of effect on the number of gonadotropin-releasing hormone-positive neurons in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 2012; 203:153-159.
69. Felix R. Insights from mouse models of absence epilepsy into Ca²⁺ channel physiology and disease etiology. *Cell Mol Neurobiol*. 2002; 22(2):103-120.

70. Fenandes OM, Tourtellotte WG. Egr3-dependent muscle spindle stretch receptor intrafusal muscle fiber differentiation and fusimotor innervation homeostasis. *J Neurosci*. 2015; 35(14):5566–5578.
71. Feng M, Wang Q, Wang H, Guan W. Tumor necrosis factor-alpha preconditioning attenuates liver ischemia/reperfusion injury through preserving sarco/endoplasmic reticulum calcium-ATPase function. *J Surg Res*. 2013; 184(2):1109-1113.
72. Filion M. *Quantitative Real-time PCR in Applied Microbiology*. Caister Academic Press 2012. ISBN 978-1-908230-01-0.
73. 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.
74. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, *et al*. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 2014; 55(4):475-482.
75. Fuentes-Santamaría V, Alvarado JC, Sánchez-Herranz A, García-Atarés N, López DE. Morphologic and Neurochemical Alterations in the Superior Colliculus of the Genetically Epilepsy-prone hamster (GPG/Vall). *Epilepsy Research* 2007; 75(2-3):206-219
76. Fuentes-Santamaría V, Alvarado JC, Sánchez-Herranz A, García-Atarés N, López DE. Decreased levels of GABA in the inferior colliculus of the epilepsy-prone hamster (GPG/Vall). *Epilepsy Research* 2008; 79(2-3):224-227
77. Fuentes-Santamaría V, Cantos R, Alvarado JC, García Atarés N, López DE. Morphological y neurochemical abnormalities in the auditory brainstem of the genetically epilepsypromote hamster (GPG/Vall). *Epilepsia* 2005; 46(7):1027-1045
78. Fujimoto T, Tanaka H, Kumamaru E, Okamura K, Miki N. Arc interacts with microtubules/microtubule-associated protein 2 and attenuates microtubule-associated protein 2 immunoreactivity in the dendrites. *J Neurosci Res*. 2004; 76(1):51-63.
79. Fumoto N, Mashimo T, Masui A, Ishida S, Mizuguchi Y, *et al*. Evaluation of seizure foci and genes in the Lgi1(L385R/+) mutant rat. *Neurosci Res*. 2014; 80:69-75.
80. Gallitano-Mendel A, Izumi Y, Tokuda K, Zorumski CF, Howell MP, *et al*. The immediate early gene early growth response gene 3 mediates adaptation to stress and novelty. *Neuroscience* 2007; 148:633-643.
81. García-Albea E. *Historia de la epilepsia*. Ed. Masson S.A. Barcelona 1999. ISBN 9788445808603
82. Garcia-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 Research* 2002; 168(1):208-222.

83. Garcia-Cairasco N, Wakamatsu H, Oliveira JAC, Gomes ELT, Del Bel EA, Mello LEA. Neuroethological and morphological (Neo–Tim staining) correlates of limbic recruitment during the development of audiogenic kindling in seizure susceptible Wistar rats. *Epilepsy Research* 1996; 26:177-192.
84. Gautier NM, Glasscock E. Spontaneous seizures in Kcna1-null mice lacking voltage-gated Kv1.1 channels activate Fos expression in select limbic circuits. *J Neurochem.* 2015; 135(1):157-164.
85. Genome assembly from the chinese hamster ovary cell line CHO-K1. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000223135.1/
86. Grabenstatter HL, Russek SJ, Brooks-Kayal AR. Molecular pathways controlling inhibitory receptor expression. *Epilepsia* 2012; 53(Suppl. 9):71-78.
87. Granjeiro EM, da Silva SFG, Giusti H, Oliveira JAC, Glass ML, Garcia-Cairasco N. Behavioral, Ventilatory and thermoregulatory responses to hypercapnia and hypoxia rat (WAR) Strain. *PLoS One.* 2016; 11(5): e0154141.
88. Gruenbaum SE, Wang H, Zaveri HP, Tang AB, Lee TS, Eid T, Dhaher R. Inhibition of glutamine synthetase in the central nucleus of the amygdala induces anhedonic behavior and recurrent seizures in a rat model of mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav.* 2015; 51:96-103.
89. Gulati S, Gera S, Menon PS, Kabra M, Kalra V. Hypothalamic hamartoma, gelastic epilepsy, precocious puberty--a diffuse cerebral dysgenesis. *Brain Dev.* 2002; 24(8):784-796.
90. Hammer J, Alvestad S, Osen KK, Skare Ø, Sonnewald U, Ottersen OP. Expression of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in the latent phase and chronic phase in the kainate model of temporal lobe epilepsy. *Glia* 2008; 56(8):856-868.
91. Harada Y, Nagao Y, Shimizu S, Serikawa T, Terada R, *et al.* Expressional analysis of inwardly rectifying Kir4.1 channels in Noda epileptic rat (NER). *Brain Res.* 2013; 1517:141-149.
92. Hasegawa S, Matsushige T, Inoue H, Takahara M, Kajimoto M, *et al.* Serum soluble CD163 levels in patients with influenza-associated encephalopathy. *Brain Dev.* 2013; 35(7):626-629.
93. Hansen KD, Irizarry RA. Removing technical variability in RNA-seq data using conditional quantile normalization. *Biostatistics* 2011; 13(2):204-2016.
94. Helbig I. Genetic Causes of Generalized Epilepsies. *Semin Neurol.* 2015; 35(3):288-292.
95. Helbig I. New technologies in molecular genetics: the impact on epilepsy research. *Prog Brain Res.* 2014; 213:253-278.

96. Herdegen T, Leah JD. Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res Rev.* 1998; 28(3):370-490.
97. Hiroi N, Marek GJ, Brown JR, Ye H, Saudou F, *et al.* Essential role of the fosB gene in molecular, cellular, and behavioral actions of chronic electroconvulsive seizures. *J Neurosci.* 1998; 18(17):6952-6962.
98. Hobson GM, Kamholz J. PLP1-Related Disorders. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, Bird TD, Fong CT, Mefford HC, Smith RJH, Stephens K, editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle 2013.
99. Holtman L, van Vliet EA, Baas F, Aronica E, Gorter JA. Complement protein 6 deficiency in PVG/c rats does not lead to neuroprotection against seizure induced cell death. *Neuroscience* 2011; 188:109-116.
100. Honkaniemi J, Sharp FR. Prolonged expression of zinc finger immediate-early gene ARNms and decreased protein synthesis following kainic acid induced seizures. *Eur J Neurosci.* 1999; 11(1):10-17.
101. Honkaniemi J, Zhang JS, Longo FM, Sharp FR. Stress induces zinc finger immediate early genes in the rat adrenal gland. *Brain Res.* 2000; 877(2):203-208.
102. Hosokawa M, Klegeris A, Maguire J, McGeer PL. Expression of complement messenger RNAs and proteins by human oligodendroglial cells. *Glia* 2003; 42(4):417-423.
103. Hsieh TF, Simler S, Vergnes M, Gass P, Marescaux C, *et al.* BDNF restores the expression of Jun and Fos inducible transcription factors in the rat brain following repetitive electroconvulsive seizures. *Exp Neurol.* 1998; 149(1):161-174.
104. Hughes JR. Absence seizures: a review of recent reports with new concepts. *Epilepsy Behav.* 2009;15(4):404-412.
105. Huss, Volker AR, Festl, Herbert, Schleifer, Karl Heinz. Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates. *Systematic and Applied Microbiology* 1983; 4(2):184-192.
106. <http://broadinstitute.github.io/picard/>
107. <http://ctdbase.org/>
108. http://support.illumina.com/sequencing/sequencing_software/casava.html
109. <http://www.cureepilepsy.org/egi/genes.asp>
110. <http://www.genbeans.org/>
111. <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>
112. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/tbl2asn2/>
113. <http://www.pantherdb.org/>
114. <http://string-db.org/>

115. <https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/subs/biosample/>
116. <https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/subs/sra/>
117. <https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/subs/tsa/>
118. Huang RP, Liu C, Fan Y, Mercola D, Adamson ED. Egr-1 negatively regulates human tumor cell growth via the ADN-binding domain. *Cancer Res.* 1995; 55:5054-5062.
119. 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):3205-3209.
120. Huxtable R, Laird H. The prolonged anticonvulsant action of taurine on genetically determined seizure-susceptibility. *Can J Neurol Sci.* 1978; 5(2):215-221.
121. International League Against Epilepsy Consortium on Complex Epilepsies. Genetic determinants of common epilepsies: a meta-analysis of genome-wide association studies. *The Lancet Neurology* 2014; 13(9):893-903.
122. ILAE. Commission on classification and terminology of the International league against epilepsy. Proposal for revised classification of epilepsias and epileptic syndromes. *Epilepsia* 1989; 30:389-399.
123. Illumina, Inc. TruSeq® RNA Sample Preparation v2 Guide. 2011-2014.
124. Inoue A, Omoto Y, Yamaguchi Y, Kiyama R, Hayashi SI. Transcription factor EGR3 is involved in the estrogen-signaling pathway in breast cancer cells. *J Mol Endocrinol* 2004; 32:649-661.
125. Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31(4):e15.
126. Ishida S, Picard F, Rudolf G, Noé E, Achaz G, *et al.* Mutations of DEPDC5 cause autosomal dominant focal epilepsies. *Nat Genet.* 2013; 45(5):552-555.
127. Jansson L, Orre K, Tingström A. Repeated electroconvulsive seizures increase the number of vessel-associated macrophages in rat hippocampus. *J ECT.* 2012; 28(3):174-179.
128. Jensen NA, Pedersen KM, Celis JE, West MJ. Failure of central nervous system myelination in MBP/c-myc transgenic mice: evidence for c-myc cytotoxicity. *Oncogene* 1998; 16(16):2123-2129.
129. Johannesen K, Marini C, Pfeffer S, Møller RS, Dorn T, Niturad C, *et al.* GABRA1: From generalized epilepsies to severe epileptic encephalopathies. *Neurology* 2016; Aug 12. pii: 10.1212/WNL.0000000000003087.
130. Jones NC, O'Brien TJ, Powell KL. Morphometric changes and molecular mechanisms in rat models of idiopathic generalized epilepsy with absence seizures. *Neurosci Lett.* 2011; 497(3):185–193.
131. Kandel ER. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 2001; 294:1030-1038.

132. Kadiyala SB, Papandrea D, Tuz K, Anderson TM, Jayakumar S, *et al.* Spatiotemporal differences in the c-fos pathway between C57BL/6J and DBA/2J mice following flurothyl-induced seizures: A dissociation of hippocampal Fos from seizure activity. *Epilepsy Res.* 2015; 109:183-196.
133. Kaltwaßer B, Schulenburg T, Beck F, Klotz M, Schäfer KH, *et al.* 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* 2013; 79:43-59.
134. KandrataVICIUS L, Balista PA, Lopes-Aguiar C, Ruggiero RN, Umeoka EH, Garcia-Cairasco N, *et al.* Animal models of epilepsy: use and limitations. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2014; 10:1693-1705.
135. Kanyshkova T, Ehling P, Cerina M, Meuth P, Zobeiri M, *et al.* Regionally specific expression of high-voltage-activated calcium channels in thalamic nuclei of epileptic and non-epileptic rats. *Mol Cell Neurosci.* 2014; 61:110-122.
136. Kaur A. Novel DEPDC5 mutations causing familial focal epilepsy with variable foci identified. *Clin Genet.* 2013; 84(4):341-342.
137. Kemerley A, Sloan C, Pfeifer W, Smith R, Drack A. A novel mutation in ACTG1 causing Baraitser-Winter syndrome with extremely variable expressivity in three generations. *Ophthalmic Genet.* 2016; 20:1-5.
138. Kesner RP. Subcortical mechanisms of audiogenic seizures. *Experimental neurology* 1966; 15(2):192-205.
139. Kim DY, Fenoglio KA, Simeone TA, Coons SW, Wu J, Chang Y, Kerrigan JF, Rho JM. GABAA receptor-mediated activation of L-type calcium channels induces neuronal excitation in surgically resected human hypothalamic hamartomas. *Epilepsia* 2008; 49(5):861-871.
140. Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biology* 2013; 14 (4):R36.
141. Klein BD, Fu YH, Ptacek LJ, White HS. Auditory deficits associated with the frings mgr1 (mass1) mutation in mice. *Dev Neurosci.* 2005; 27(5):321-332.
142. Koboldt DC, Chen K, Wylie T, Larson DE, McLellan MD, *et al.* VarScan: variant detection in massively parallel sequencing of individual and pooled samples. *Bioinformatics* 2009; 25(17):2283-2285.
143. Kormos V, Gáspár L, Kovács LÁ, Farkas J, Gaszner T, *et al.* Reduced response to chronic mild stress in PACAP mutant mice is associated with blunted FosB expression in limbic forebrain and brainstem centers. *Neuroscience* 2016; 330:335-358.

144. Korosec B, Glavac D, Volavsek M, Ravnik-Glavac M. ATP2A3 gene is involved in cancer susceptibility. *Cancer Genet Cytogenet.* 2009; 188(2):88-94.
145. Laboratorio de Cole Trapnell. University of Washington. <http://cole-trapnell-lab.github.io/cufflinks/>
146. Lal D, Reinthaler EM, Schubert J, Muhle H, Riesch E, *et al.* DEPDC5 mutations in genetic focal epilepsies of childhood. *Ann Neurol.* 2014; 75(5):788-792.
147. Lan Y, Sun T, Zhang C, Yuan C, Yang Z, Wang F. Effects of GABAB receptor expression level on cognitive impairment and Arc/Arg3.1 expression in induced epileptic rats model. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2016; 96(5):380-383.
148. Lazarevic V, Zullo AJ, Schweitzer MN, Staton TL, Gallo EM, *et al.* The gene encoding early growth response 2, a target of the transcription factor NFAT, is required for the development and maturation of natural killer T cells. *Nat Immunol.* 2009; 10:306–313.
149. Levin WJ, Casey G, Ramos JC, Arboleda MJ, Reissmann PT, Slamon DJ. Tumor suppressor and immediate early transcription factor genes in non-small cell lung cancer. *Chest* 1994; 106:372S–3726S.
150. Lewis NE, Liu X, Li Y, Nagarajan H, Yerganian G, *et al.* Genomic landscapes of Chinese hamster ovary cell lines as revealed by the *Cricetulus griseus* draft genome. *Nat Biotechnol.* 2013; 31(8):759-765.
151. Li KX, Lu YM, Xu ZH, Zhang J, Zhu JM, *et al.* Neuregulin 1 regulates excitability of fast-spiking neurons through Kv1.1 and acts in epilepsy. *Nat Neurosci.* 2011; 15(2):267-273.
152. Li L, Carter J, Gao X, Whitehead J, Tourtellotte WG. The neuroplasticity-associated arc gene is a direct transcriptional target of early growth response (Egr) transcription factors. *Mol Cell Biol.* 2005; 25(23):10286-10300.
153. Liang K, Du W, Zhu W, Liu S, Cui Y, *et al.* Contribution of different mechanisms to pancreatic beta-cell hyper-secretion in non-obese diabetic (NOD) mice during pre-diabetes. *J Biol Chem.* 2011; 286(45):39537-39545.
154. Libbey JE, Kennett NJ, Wilcox KS, White HS, Fujinami RS. Interleukin-6, produced by resident cells of the central nervous system and infiltrating cells, contributes to the development of seizures following viral infection. *J Virol.* 2011; 85(14):6913-6922.
155. Lindecke A, Korte M, Zagrebelsky M, Horejschi V, Elvers M, Widera D, *et al.* Longterm depression activates transcription of immediate early transcription factor genes: involvement of serum response factor. *Eur J Neurosci.* 2006; 24:555–563.
156. Lisowski P, Wiczorek M, Goscik J, Juszczak GR, Stankiewicz AM, *et al.* Effects of chronic stress on prefrontal cortex transcriptome in mice displaying different genetic backgrounds. *J Mol Neurosci.* 2013; 50(1):33-57.
157. 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.

158. López-López D, et al, Overexpression of the immediate-early genes Egr1, Egr2, and Egr3 in two strains of rodents susceptible to audiogenic seizures, *Epilepsy Behav.* 2015; <http://dx.doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.1>
159. López-López D, Muñoz LJ, Castellano O, Sancho C, Hernández-Noriega S, et al. Study of *Mesocricetus auratus* Inferior Colliculus Transcriptome after acoustic stimulation. 2014. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/230618>
160. Lv X, Guo F, Xu X, Chen Z, Sun X, et al. Abnormal alterations in the Ca²⁺/CaV1.2/calmodulin/camKII signaling pathway in a tremor rat model and in cultured hippocampal neurons exposed to Mg²⁺-free solution. *Mol Med Rep.* 2015; 12(5):6663-66671.
161. Madsen TM, Woldbye DP, Bolwig TG, Mikkelsen JD. Kainic acid seizure suppression by neuropeptide Y is not correlated to immediate early gene mRNA levels in rats. *Neurosci Lett.* 1999; 271(1):21-24.
162. Magdaleno-Madrigal VM, Valdés-Cruz A, Martínez-Vargas D, Martínez A, Almazán S, et al. Effect of electrical stimulation of the nucleus of the solitary tract on the development of electrical amygdaloid kindling in the cat. *Epilepsia* 2004; 43 (9):964-969.
163. Maeker T, Van Wilk E, Overlack N, Kersten F., McGee J, Goldmann T, Wolfrum U. A novel Usher protein network at the periciliary reloading point between molecular transport machineries in vertebrate photoreceptor cells. *Human Molecular Genetics* 2008; 17(1):71-86.
164. Malpass K. Epilepsy: Discovery of DEPDC5 mutations provides further evidence of a genetic link to inherited focal epilepsies. *Nat Rev Neurol.* 2013; 9(5):237.
165. Mandel-Brehm C, Salogiannis J, Dhamne SC, Rotenberg A, Greenberg ME. Seizure-like activity in a juvenile Angelman syndrome mouse model is attenuated by reducing Arc expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112(16):5129-5134.
166. Mandelzys A, Gruda MA, Bravo R, Morgan JJ. Absence of a persistently elevated 37 kDa fos-related antigen and AP-1-like DNA-binding activity in the brains of kainic acid-treated fosB null mice. *J Neurosci.* 1997; 17(14):5407-5415.
167. Martin C, Meloche C, Rioux MF, Nguyen DK, Carmant L, et al. A recurrent mutation in DEPDC5 predisposes to focal epilepsies in the French-Canadian population. *Clin Genet.* 2014; 86(6):570-574.
168. Martín AIP. Neuroquímica de las crisis epilépticas en el hámster GASH: Sal adulto. Papel del cotransportador KCC2, rGABAA, NOS y PrPc. Tesis doctoral 2009. Universidad Autónoma de Madrid. <https://repositorio.uam.es/handle/10486/4339>
169. 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.

170. McMillan DR, White PC. Loss of the transmembrane and cytoplasmic domains of the very large G-protein-coupled receptor-1 (VLGR1 or Mass1) causes audiogenic seizures in mice. *Mol Cell Neurosci*. 2004; 26(2):322-329.
171. Miller MB, Tang YW. Basic Concepts of Microarrays and Potential Applications in Clinical Microbiology. *Clin Microbiol*. 2009; 22(4):611-633
172. Mohelnikova-Duchonova B, Brynychova V, Hlavac V, Kocik M, Oliverius M, *et al*. The association between the expression of solute carrier transporters and the prognosis of pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2013; 72(3):669-682.
173. Morey JS, Ryan JC, Van Dolah FM. Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biol Proced Online* 2006; 8:175-193.
174. Morris GL. 3rd, Vanderkolk C. Human sexuality, sex hormones, and epilepsy. *Epilepsy Behav*. 2005; 7(Suppl 2):S22-28.
175. Moseley BD, Dhamija R, Wirrell EC, Nickels KC. Historic, clinical and prognostic features of epileptic encephalopathies caused by CDKL5 mutations. *Pediatr Neurol*. 2012; 46: 101-115.
176. Moteki H, Yoshimura H, Azaiez H, Booth KT, Shearer AE, *et al*. USH2 caused by GPR98 mutation diagnosed by massively parallel sequencing in advance of the occurrence of visual symptoms. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2015; 124(Suppl 1):123S-128S.
177. Muñoz de la Pascua L, López DE. Establecimiento Caracterización de una línea de hámsteres sirios propensos a padecer convulsiones audiógenas. Ed. Muñoz de la Pascua, Salamanca 2005. ISBN 84-609-5027.
178. Muñoz LJ, Carballosa-Gautam MM, Yanowsky K, Garcia-Atarés N, López DE. The genetic audiogenic seizure hamster from Salamanca: The GASH:Sal. *Epilepsy Behav*. 2016; (online). doi: 10.1016/j.yebeh.2016.03.002
179. N'Gouemo P, Akinfiresoye LR, Allard JS, Lovinger DM. Alcohol Withdrawal-Induced Seizure Susceptibility is Associated with an Upregulation of CaV1.3 Channels in the Rat Inferior Colliculus. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2015; 18(7):pyu123.
180. Nappi C, Meo R, Di Carlo C, Estraneo A, Bilo L. Reduced fertility and neuroendocrine dysfunction in women with epilepsy. *Gynecol Endocrinol*. 1994; 8(2):133-145.
181. Niesters HG. Quantitation of viral load using real-time amplification. *Methods* 2001; 25:419-429.
182. Niitani M, Nishida K, Okuda H, Nagai K, Fujimoto S, Nagasawa K. Transport characteristics of mouse concentrative nucleoside transporter 1. *Int J Pharm*. 2010; 388(1-2):168-174.

183. Noebels JL, Qiao X, Bronson RT, Spencer C, Davisson MT. Stargazer: a new neurological mutant on chromosome 15 in the mouse with prolonged cortical seizures. *Epilepsy Res.* 1990; 7(2):129-135.
184. O'Donovan KJ, Tourtellotte WG, Millbrandt J, Baraban JM. The EGR family of transcription-regulatory factors progress at the interface of molecular and systems neuroscience. *Trends Neurosci.* 1999; 22:167-173.
185. Ottman, R. Analysis of genetically complex epilepsies. *Epilepsia* 2005; 46(Suppl 10): 7-14.
186. Park JW, Park ES, Choi EN, Park HY, Jung SC. Altered brain gene expression profiles associated with the pathogenesis of phenylketonuria in a mouse model. *Clin Chim Acta.* 2009; 401(1-2):90-99.
187. Patwardhan S, Gashler A, Siegel MG, Chang LC, Joseph LJ, *et al.* EGR3, a novel member of the Egr family of genes encoding immediate-early transcription factors. *Oncogene* 1991; 6:917-28.
188. Peltola J, Palmio J, Korhonen L, Suhonen J, Miettinen A, Hurme M, Lindholm D, Keränen T. Interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist in cerebrospinal fluid from patients with recent tonic-clonic seizures. *Epilepsy Res.* 2000; 41(3):205-211.
189. Peñagarikano O, Abrahams BS, Herman EI, Winden KD, Gdalyahu A, *et al.* Absence of CNTNAP2 leads to epilepsy, neuronal migration abnormalities, and core autism-related deficits. *Cell* 2011; 147(1):235-246.
190. Pernot F, Dorandeu F, Beaup C, Peinnequin A. Selection of reference genes for real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction in hippocampal structure in a murine model of temporal lobe epilepsy with focal seizures. *J Neurosci Res.* 2010; 88(5):1000-1008.
191. Picard F, Makrythanasis P, Navarro V, Ishida S, de Bellescize J, *et al.* DEPDC5 mutations in families presenting as autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Neurology* 2014; 82(23):2101-2106.
192. Pio R, Jia Z, Baron VT, Mercola D. Early growth response 3 (Egr3) is highly overexpressed in non-relapsing prostate cancer but not in relapsing prostate cancer. *PLoS One* 2013; 8(1):e54096.
193. Pippucci T, Licchetta L, Baldassari S, Palombo F, Menghi V, *et al.* Epilepsy with auditory features: A heterogeneous clinico-molecular disease. *Neurol Genet.* 2015; 1(1):e5.
194. Plath N, Ohana O, Dammermann B, Errington ML, Schmitz D, *et al.* Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. *Neuron* 2006; 52(3):437-444.
195. Poduri A. DEPDC5 does it all: shared genetics for diverse epilepsy syndromes. *Ann Neurol.* 2014; 75(5):631-633.

196. Poirier R, Cheval H, Mailhes C, Garel S, ChaARNy P, *et al.* Distinct functions of Egr gene family members in cognitive processes. *Front Neurosci.* 2008; 2(1):47-55.
197. Prieto-Martín AI, Llorens S, Muñoz LJ, López DE, Nava E, Cabo C. Molecular and neurochemical substrates of the audiogenic seizure strains: the GASH:Sal model. *Epilepsy Behav.* 2015 (online) doi: 10.1016/j.yebeh.2015.05.025
198. Prieto-Martín AI, Llorens S, Pardal-FeARNndez JM, Muñoz L, López DE, *et al.* 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.
199. Quach DH, Oliveira-Fenandes M, Gruner KA, Tourtellotte WG. A sympathetic neuron autonomous role for Egr3-mediated gene regulation in dendrite morphogenesis and target tissue innervation. *J Neurosci.* 2013; 33(10):4570-83.
200. Radzicki D, Yau HJ, Pollema-Mays SL, Mlsna L, Cho K., Koh S., Martina M. Temperature-sensitive Cav1.2 calcium channels support intrinsic firing of pyramidal neurons and provide a target for the treatment of febrile seizures. *J Neurosci.* 2013; 33(24):9920-9931.
201. Raisinghani, M, & Faingold, C. L. 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.
202. Rakhade SN, Yao B, Ahmed S, Asano E, Beaumont TL, Shah AK *et al.* A Common Pattern of Persistent Gene Activation in Human Neocortical Epileptic Foci. *Ann Neurol.* 2005; 58(5):736-747.
203. Ramaglia V, Tannemaat MR, de Kok M, Wolterman R, Vigar MA, *et al.* Complement inhibition accelerates regeneration in a model of peripheral nerve injury. *Mol Immunol.* 2009; 47(2-3):302-309.
204. Ranstam J. Multiple P-values and Bonferroni correction. *Osteoarthritis Cartilage* 2016; 24(5):763-774.
205. Rio DC, Ares M. Jr, Hannon GJ, Nilsen TW. Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harb Protoc.* 2010; pdb.prot5439.
206. Risso D, Schwartz K, Gavin Sherlock G, Dudoit S. GC-Content Normalization for RNA-Seq Data. *BMC Bioinformatics* 2011; 12:480
207. Roberts DS, Hu Y, Lund IV, Brooks-Kayal AR, Russek SJ. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-induced synthesis of early growth response factor 3 (Egr3) controls the levels of type A GABA receptor α 4 subunits in hippocampal neurons. *J Biol Chem.* 2006; 281(40):29431-29435.
208. Roberts DS, Raol YH, Bandyopadhyay S, Lund IV, Budreck EC, *et al.* Egr3 stimulation of GABRA4 promoter activity as a mechanism for seizure-induced upregulation

of GABAA receptor $\alpha 4$ subunit expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(33):11894-11899.

209. Rodríguez-Mulero S, Errasti-Murugarren E, Ballarín J, Felipe A, Doucet A, Casado FJ, Pastor-Anglada M. Expression of concentrative nucleoside transporters SLC28 (CNT1, CNT2, and CNT3) along the rat nephron: effect of diabetes. *Kidney Int.* 2005; 68(2):665-672.

210. Roe RH, Fisher Y, Eagle RC. Jr, Fine HF, Cunningham ET. Jr. Oculoleptomeningeal amyloidosis in a patient with a TTR Val30Gly mutation in the transthyretin gene. *Ophthalmology* 2007; 114(11):e33-37.

211. Romanenko SA, Volobouev VT, Perelman P, Lebedev VS, Serdukova NA, *et al.* Karyotype evolution and phylogenetic relationships of hamsters (Cricetidae, Muroidea, Rodentia) inferred from chromosomal painting and banding comparison. *Chromosome Res.* 2007; 15(3):283-297.

212. Romcy-Pereira, RN, Garcia-Cairasco, N. Hippocampal cell proliferation and epileptogenesis after audiogenic kindling are not accompanied by mossy fiber sprouting or Fluoro-Jade staining. *Neuroscience* 2003; 119 (2):533-546.

213. Ronkina N, Menon MB, Schwermann J, Arthur JSC, Legault H, *et al.* Stress induced gene expression: a direct role for MAPKAP kinases in transcriptional activation of immediate early genes. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39(7):2503-2518.

214. Rosati A, Marconi S, Pollo B, Tomassini A, Lovato L, *et al.* Epilepsy in glioblastoma multiforme: correlation with glutamine synthetase levels. *J Neurooncol.* 2009; 93(3):319-324.

215. Rosati A, Poliani PL, Todeschini A, Cominelli M, Medicina D, *et al.* Glutamine synthetase expression as a valuable marker of epilepsy and longer survival in newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Neuro Oncol.* 2013; 15(5):618-625.

216. Ross KC, Coleman JR. Developmental and genetic audiogenic seizure models: behavior and biological substrates. *Neurosci Biobehav Rev* 2000; 24(6):639-653.

217. Rylski M, Amborska R, Zybura K, Michaluk P, Bielinska B, *et al.* JunB is a repressor of MMP-9 transcription in depolarized rat brain neurons. *Mol Cell Neurosci.* 2009; 40(1):98-110.

218. Ryu SH, Kwak MJ, Hwang UW. Complete mitochondrial genome of the Eurasian flying squirrel *Pteromys volans* (Sciuromorpha, Sciuridae) and revision of rodent phylogeny. *Mol Biol Rep.* 2013; 40: 1917-1926.

219. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239:487-491

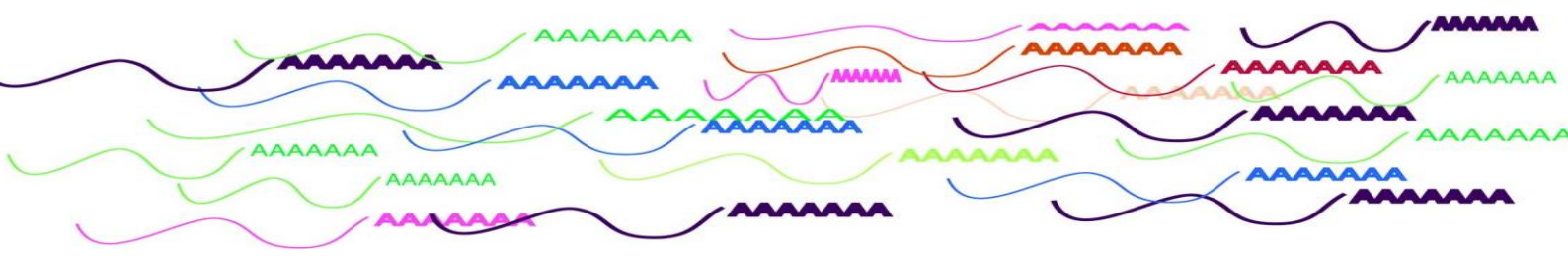
220. Salas-Puig, Mateos V, Amorín M, Calleja S, Jiménez L. Reflex epilepsies, *Rev Neurol.* 2000; 30 Suppl 1:85-9.
221. Sánchez-Benito D, Gomez-Nieto R, Batista Murashima AA, Hernández-Noriega S, Oliveira JAC, *et al.* Morpho-functional alterations in the olivocochlear efferent system of the genetic audiogenic seizure-prone hamster GASH:Sal. *Epilepsy Behav* 2016 (in press). doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yebeh.2016.05.040>.
222. Scerri T, Riseley JR, Gillies G, Pope K, Burgess R, Mandelstam SA, *et al.* Familial cortical dysplasia type IIA caused by a germline mutation in DEPDC5. *Ann Clin Transl Neurol.* 2015; 2(5):575-580.
223. Scheel H, Tomiuk S, Hofmann K. A common protein interaction domain links two recently identified epilepsy genes. *Hum Mol Genet.* 2002; 11(15):1757-1762.
224. Scheffer IE, Heron SE, Regan BM, Mandelstam S, Crompton DE, *et al.* Mutations in mammalian target of rapamycin regulator DEPDC5 cause focal epilepsy with brain malformations. *Ann Neurol.* 2014; 75(5):782-787.
225. Schmeltzer SN, Vollmer LL, Rush JE, Weinert M, Dolgas CM, Sah R. History of chronic stress modifies acute stress-evoked fear memory and acoustic startle in male rats. *Stress.* 2015; 18(2):244-253.
226. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* 2008; 3:1101-1108.
227. Senba E, Ueyama T. Stress-induced expression of immediate early genes in the brain and peripheral organs of the rat. *Neurosci Res.* 1997; 29(3):183-207.
228. Serikawa T, Mashimo T, Kuramoto T, Voigt B, Ohno Y, Sasa M. Advances on genetic rat models of epilepsy. *Exp Anim.* 2015;64(1):1-17.
229. Seyfried TN. Audiogenic seizures in mice. *Fed Proc* 1979; 38(10):2399-404.
230. Shieh JTC, Huang Y, Gilmore J, Srivastava D. Elevated miR-499 levels blunt the cardiac stress response. *PLoS One* 2011; 6(5):e19481.
231. Simon Anders, Paul Theodor Pyl, Wolfgang Huber. HTSeq — A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 2014; 31(2):166-169.
232. Skradski SL, Clark AM, Jiang H, White HS, Fu YH, Ptáček LJ. A novel gene causing a mendelian audiogenic mouse epilepsy. *Neuron* 2001; 31(4):537-544.
233. Sloviter RS. Experimental status epilepticus in animals: What are we modeling? *Epilepsia* 2009; 50 Suppl 12:11-13.
234. Sorrells SF, Caso JR, Munhoz CD, Hu CK, Tran KV, *et al.* Glucocorticoid signaling in myeloid cells worsens acute CNS injury and inflammation. *J Neurosci.* 2013; 33(18):7877-7889.
235. Soto Sedano JC, López Carrascal CE. RNA-seq: herramienta transcriptómica útil para el estudio de interacciones planta-patógeno. *Fitosanidad* 2012; 16(2):101-113.

236. Sta M, Cappaert NL, Ramekers D, Ramaglia V, Wadman WJ, Baas F. C6 deficiency does not alter intrinsic regeneration speed after peripheral nerve crush injury. *Neurosci Res.* 2014; 87:26-32.
237. Staats KA, Pombal D, Schönefeldt S, Van Helleputte L, Maurin H, *et al.* Transcriptional upregulation of myelin components in spontaneous myelin basic protein-deficient mice. *Brain Res.* 2015; 1606:125-132.
238. Strelakova T, Zörner B, Zacher C, Sadovska G, Herdegen T, Gass P. Memory retrieval after contextual fear conditioning induces c-Fos and JunB expression in CA1 hippocampus. *Genes Brain Behav.* 2003; 2(1):3-10.
239. Striano P, Serioli E, Santulli L, Manna I, Labate A, *et al.* DEPDC5 mutations are not a frequent cause of familial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia.* 2015; 56(10):e168-71.
240. Subramanian M, Senthil N, Sujatha S. Idiopathic generalized epilepsy and hypokalemic periodic paralysis in a family of South Indian descent. *Case Rep Neurol Med.* 2015; 2015:906049.
241. Sumitomo S, Fujio K, Okamura T, Yamamoto K. Egr2 and Egr3 are the unique regulators for systemic autoimmunity. *JAKSTAT* 2013; 2(2):e23952.
242. Sun HL, Deng DP, Pan XH, Wang CY, Zhang XL *et al.* A sub-threshold dose of pilocarpine increases glutamine synthetase in reactive astrocytes and enhances the progression of amygdaloid-kindling epilepsy in rats. *Neuroreport* 2016; 27(4):213-219.
243. Sun HL, Zhang SH, Zhong K, Xu ZH, Feng B, *et al.* A Transient Upregulation of Glutamine Synthetase in the Dentate Gyrus Is Involved in Epileptogenesis Induced by Amygdala Kindling in the Rat. *PLoS One* 2013; 8(6):e66885.
244. Swamy M, Yusof WR, Sirajudeen KN, Mustapha Z, Govindasamy C. Decreased glutamine synthetase, increased citrulline-nitric oxide cycle activities, and oxidative stress in different regions of brain in epilepsy rat model. *J Physiol Biochem.* 2011; 67(1):105-113.
245. Swijsen A, Nelissen K, Janssen D, Rigo JM, Hoogland G. Validation of reference genes for quantitative real-time PCR studies in the dentate gyrus after experimental febrile seizures. *BMC Res Notes.* 2012; 5:685.
246. Szyndler J, Maciejak P, Wisłowska-Stanek A, Lehner M, Płaźnik A. Changes in the Egr1 and Arc expression in brain structures of pentylentetrazole-kindled rats. *Pharmacol Rep.* 2013; 65(2):368-378.
247. Tevoufouet EE, Nembo EN, Dibué-Adjei M, Hescheler J, Nguemo F, Schneider T. Cardiac functions of voltage-gated Ca(2+) channels: role of the pharmacoresistant type (E-/R-Type) in cardiac modulation and putative implication in sudden unexpected death in epilepsy (SUDEP). *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2014; 167:115-139.
248. Tourtellotte WG, Milbrandt J. Sensory ataxia and muscle spindle agenesis in mice lacking the transcription factor Egr3. *Nat Genet.* 1998; 20:87-91.

249. van der Hel WS, Hessel EV, Bos IW, Mulder SD, Verlinde SA, van Eijsden P., de Graan PN. Persistent reduction of hippocampal glutamine synthetase expression after status epilepticus in immature rats. *Eur J Neurosci.* 2014; 40(12):3711-3719.
250. van der Hel WS, Notenboom RG, Bos IW, van Rijen PC, van Veelen CW, de Graan PN. Reduced glutamine synthetase in hippocampal areas with neuron loss in temporal lobe epilepsy. *Neurology.* 2005; 64(2):326-333.
251. van Kranenburg M, Hoogeveen-Westerveld M, Nellist M. Preliminary functional assessment and classification of DEPDC5 variants associated with focal epilepsy. *Hum Mutat.* 2015; 36(2):200-209.
252. van Luijtelaar EL, Drinkenburg WH, van Rijn CM, Coenen AM. Rat models of genetic absence epilepsy: what do EEG spike-wave discharges tell us about drug effects? *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2002;24 Suppl D:65–70.
253. Vazdarjanova A, Ramirez-Amaya V, Insel N, Plummer TK, Rosi S, *et al.* Spatial exploration induces ARC, a plasticity-related immediate-early gene, only in calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-positive principal excitatory and inhibitory neurons of the rat forebrain. *J Comp Neurol.* 2006; 498(3):317-329.
254. Vezzani A, Granata T. Brain Inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. *Epilepsia* 2005; 46:1724-1243.
255. Wang WZ, Lu LX, Li DJ, Lu JJ, He M, *et al.* Effect of human concentration nucleoside transporters 1 and multi-drug resistance protein 4 gene polymorphism on response of chronic hepatitis B to nucleoside analogues treatment. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2014; 45(6):950-955.
256. Willott JF, Lu SM. Midbrain pathways of audiogenic seizures in DBA/2 mice. *Exp Neurol* 1980; 70(2):288–299.
257. Wong AL, Yap HL, Yeo WL, Soong R, Ng SS, *et al.* Gemcitabine and platinum pathway pharmacogenetics in Asian breast cancer patients. *Cancer Genomics Proteomics.* 2011; 8(5):255-259.
258. World Health Organization Neurological Disorders Report. WHO Press 2006, Ginebra, Suiza. ISBN 978 92 4 156336 9.
259. Worley PF, Bhat RV, Baraban JM, Erickson CA, McNaughton BL, Barnes CA. Thresholds for synaptic activation of transcription factors in hippocampus: correlation with long-term enhancement. *J Neurosci* 1993; 13:4776-4786.
260. Xiong ZQ, Qian W, Suzuki K, McNamara JO. Formation of complement membrane attack complex in mammalian cerebral cortex evokes seizures and neurodegeneration. *J Neurosci.* 2003; 23(3):955-960.

261. Xu XY, Gou WF, Yang X, Wang GL, Takahashi H *et al.* Aberrant SERCA3 expression is closely linked to pathogenesis, invasion, metastasis, and prognosis of gastric carcinomas. *Tumour Biol.* 2012; 33(6):1845-1854
262. Yagi H, Noguchi Y, Kitamura K, Sato M. Deficiency of *Vlgr1* resulted in deafness and susceptibility to audiogenic seizures while the degree of hearing impairment was not correlated with seizure severity in C57BL/6- and 129-backcrossed lines of *Vlgr1* knockout mice. *Neurosci Lett.* 2009; 461(2):190-195.
263. Yagi H, Takamura Y, Yoneda T, Konno D, Akagi Y, *et al.* *Vlgr1* knockout mice show audiogenic seizure susceptibility. *J Neurochem.* 2005; 92(1):191-202.
264. Yang J, Huang XF, Tong Y, Jin ZB. Targeted exome sequencing identified two novel truncation mutations in GPR98 causing Usher syndrome. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2016; 44(3):197-199.
265. Yang JW, Czech T, Felizardo M, Baumgartner C, Lubec G. Aberrant expression of cytoskeleton proteins in hippocampus from patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Amino Acids.* 2006; 30(4):477-493.
266. Yang L, Long C, & Faingold, C. L. 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.
267. Ye Y, Xiong J, Hu J, Kong M, Cheng L, *et al.* Altered hippocampal myelinated fiber integrity in a lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy: a histopathological and stereological investigation. *Brain Res.* 2013; 1522:76-87.
268. You Y, Bai H, Wang C, Chen LW, Liu B, Zhang H, Gao GD. Myelin damage of hippocampus and cerebral cortex in rat pentylenetetrazol model. *Brain Res.* 2011; 1381:208-216.
269. You Y, Zhao Y, Bai H, Liu Z, Meng F, Zhang H, Xu R. Glatiramer acetate, an anti-demyelination drug, reduced rats' epileptic seizures induced by pentylenetetrazol via protection of myelin sheath. *Eur J Pharm Sci.* 2013; 49(3):366-370.
270. Yuan M, Wang W, Chen H, Lu J, He M, *et al.* ABCC4, ABCC5 and SLC28A1 polymorphisms: host genome on responses of chronic hepatitis B patients with entecavir treatment. *Antivir Ther.* 2016; 29.
271. Yutsudo N, Kamada T, Kajitani K, Nomaru H, Katogi A, *et al.* FosB-null mice display impaired adult hippocampal neurogenesis and spontaneous epilepsy with depressive behavior. *Neuropsychopharmacology.* 2013; 38(5):895-906.
272. Zhang PS, Wang F, Liu QZ, Xu WZ, Qi JH, Liu Z, Sun T. mRNA expression of activity-regulated cytoskeletal-associated protein in hippocampus induced by insular-kindled rats. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2010; 90(39):2782-2786.

273. Woo HI, Kim KK, Choi H, Kim S, Jang KT, *et al.* Effect of genetic polymorphisms on therapeutic response and clinical outcomes in pancreatic cancer patients treated with gemcitabine. *Pharmacogenomics*. 2012; 13(9):1023-1035.



9. ANEXOS

| Gen | FC | p | Control | GASH:Sal |
|----------------|-----------|---------|------------|------------|
| <i>Abcc2</i> | -2,09028 | 0,04868 | 79,18859 | 37,88424 |
| <i>Aldh1a2</i> | 2,00508 | 0,02894 | 53,84824 | 107,9701 |
| <i>Arc</i> | 2,07594 | 0,05571 | 36,95468 | 76,71559 |
| <i>Asb14</i> | 2,43987 | 0,00326 | 52,7924 | 128,80643 |
| <i>Atp2a3</i> | -5,4915 | 0 | 702,13886 | 127,85932 |
| <i>Bace2</i> | -2,30651 | 0,05076 | 63,35087 | 27,46608 |
| <i>C1s</i> | -2,32351 | 0,00036 | 209,05789 | 89,97508 |
| <i>C6</i> | -10,03333 | 0,00001 | 76,02105 | 7,57685 |
| <i>Car3</i> | 2,34603 | 0,04643 | 27,45205 | 64,40321 |
| <i>Cav1</i> | -2,02197 | 0,00305 | 195,33186 | 96,60482 |
| <i>Cd163</i> | 6,45847 | 0,00022 | 10,55848 | 68,19164 |
| <i>Cmya5</i> | 2,23131 | 0,00119 | 84,46783 | 188,47411 |
| <i>Dcdc5</i> | -3,0443 | 0,00702 | 74,9652 | 24,62476 |
| <i>Den</i> | 2,44308 | 0,00001 | 129,86929 | 317,28054 |
| <i>Egr1</i> | 3,53465 | 0 | 88,69122 | 313,49212 |
| <i>Egr2</i> | 18,67412 | 0 | 11,61433 | 216,8873 |
| <i>Egr3</i> | 5,41528 | 0 | 171,04736 | 926,26977 |
| <i>Fabp7</i> | -2,50833 | 0,01999 | 76,02105 | 30,3074 |
| <i>Fat3</i> | -2,50067 | 0 | 1120,25464 | 447,98119 |
| <i>Fhl2</i> | 2,85412 | 0,0032 | 34,84298 | 99,44614 |
| <i>Fos</i> | 3,2445 | 0 | 446,62367 | 1449,07234 |
| <i>Fosb</i> | 12,15041 | 0 | 11,61433 | 141,11881 |
| <i>Fosl2</i> | 2,23209 | 0,0168 | 45,40146 | 101,34035 |
| <i>Gadd45g</i> | 2,80119 | 0,00016 | 60,18333 | 168,58489 |
| <i>Gng13</i> | -3,34444 | 0,01566 | 53,84824 | 16,1008 |
| <i>Gpr83</i> | -3,14771 | 0,02459 | 50,6807 | 16,1008 |
| <i>Gpr98</i> | -2,27335 | 0,01073 | 109,80818 | 48,30241 |
| <i>Grin2c</i> | -2,85671 | 0,00561 | 86,57953 | 30,3074 |
| <i>Igfn1</i> | -2,66586 | 0,03309 | 58,07164 | 21,78344 |
| <i>Islr</i> | 2,32558 | 0,04501 | 28,50789 | 66,29743 |
| <i>Junb</i> | 4,10062 | 0 | 66,51842 | 272,76656 |
| <i>Krt19</i> | 2,22806 | 0,00424 | 65,46257 | 145,85434 |
| <i>Lum</i> | 2,17457 | 0,04508 | 34,84298 | 75,76849 |
| <i>Mybpc3</i> | -3,90185 | 0,01699 | 44,34561 | 11,36527 |
| <i>Myo15</i> | -3,06574 | 0,01769 | 58,07164 | 18,94212 |
| <i>Myom1</i> | -2,94381 | 0,00005 | 178,4383 | 60,61479 |
| <i>Npas4</i> | 3,33019 | 0 | 260,79443 | 868,49629 |
| <i>Nup155</i> | -2,11685 | 0 | 1208,94586 | 571,10498 |
| <i>Ogn</i> | 2,90305 | 0,00011 | 58,07164 | 168,58489 |
| <i>Rab29</i> | -3,34444 | 0,01039 | 60,18333 | 17,99502 |

| Gen | FC | <i>p</i> | Control | GASH:Sal |
|-----------------|----------|----------|-----------|-----------|
| <i>Rem2</i> | 2,35078 | 0,03445 | 30,61959 | 71,98006 |
| <i>Rnf125</i> | 3,36379 | 0,03402 | 12,67017 | 42,61977 |
| <i>Sertad1</i> | 2,38053 | 0,04181 | 27,45205 | 65,35032 |
| <i>Sfrp2</i> | 2,27115 | 0,01023 | 49,62485 | 112,70563 |
| <i>Slc13a4</i> | 3,18439 | 0,00911 | 21,11696 | 67,24453 |
| <i>Slc22a12</i> | -2,02222 | 0,00632 | 164,71227 | 81,45112 |
| <i>Slc28a1</i> | 13,90365 | 0,00003 | 4,22339 | 58,72058 |
| <i>Slc6a12</i> | 2,19912 | 0,04826 | 32,73129 | 71,98006 |
| <i>Slc6a13</i> | 2,19837 | 0 | 203,77865 | 447,98119 |
| <i>Slitrk6</i> | -2,14095 | 0,00241 | 178,4383 | 83,34534 |
| <i>Smg1</i> | -2,74722 | 0,01395 | 72,85351 | 26,51897 |
| <i>Thbs1</i> | 2,34504 | 0,00105 | 73,90935 | 173,32042 |
| <i>Tmsb15b</i> | -2,52977 | 0,03454 | 62,29503 | 24,62476 |
| <i>Tph2</i> | -2,81983 | 0,05057 | 45,40146 | 16,1008 |
| <i>Traf5</i> | 3,76744 | 0,02895 | 10,55848 | 39,77846 |
| <i>Ttr</i> | 21,14381 | 0 | 7,39094 | 156,27251 |
| <i>Vcl</i> | 5,08306 | 0,02456 | 6,33509 | 32,20161 |
| <i>Wnk4</i> | -2,80768 | 0,00043 | 143,59532 | 51,14373 |

Anexo 1. Lista de genes diferencialmente expresados filtrados usando dos parámetros: $p \leq 0,05$ y $FC \geq 2$, por orden alfabético. La tabla indica el gen, el valor de la expresión diferencial (FC), la validez de la medida (p) y la señal recogida en el control y GASH:Sal. En verde los valores sobre-expresados y en rojo los infra-expresados.

| Gen | FC | <i>p</i> | Control | GASH:Sal |
|---------------------|--------------|------------|------------|------------|
| <i>Depdc5</i> | 4,485049834 | 0,59325229 | 1,05584791 | 4,73553051 |
| <i>Charn2</i> | 1,750616225 | 0,06293346 | 65,4625706 | 114,599838 |
| <i>Ntrk2</i> | 1,443370583 | 0,12754717 | 116,14327 | 167,63778 |
| <i>Entpd1</i> | 1,33192389 | 0,54423523 | 34,8429811 | 46,408199 |
| <i>Slc4a10</i> | 1,22851365 | 0,61652754 | 48,569004 | 59,6676844 |
| <i>Cacna1h</i> | 1,212213159 | 0,1021734 | 682,077752 | 826,823626 |
| <i>Lgi4</i> | 1,205816677 | 0,59690664 | 64,4067227 | 77,6627003 |
| <i>Grm8</i> | 1,196013289 | 0,68755405 | 44,3456123 | 53,0379417 |
| <i>Glul</i> | 1,173041382 | 0,02327122 | 7709,80146 | 9043,91616 |
| <i>Grik5</i> | 1,172534968 | 0,24977678 | 457,182146 | 536,062053 |
| <i>Nf2</i> | 1,162375415 | 0,25809805 | 506,806998 | 589,099995 |
| <i>Aldh7a1</i> | 1,151566849 | 0,30520347 | 468,796473 | 539,850478 |
| <i>Actb</i> | 1,149626979 | 0,03962516 | 13155,865 | 15124,3373 |
| <i>Map2</i> | 1,146179402 | 0,88658944 | 19,0052624 | 21,7834403 |
| <i>Prrt2</i> | 1,141453259 | 0,22594719 | 879,521311 | 1003,93247 |
| <i>Abcb1a</i> | 1,130378413 | 0,62777932 | 129,869293 | 146,801446 |
| <i>Loc100909544</i> | 1,109536838 | 0,28632407 | 1292,35785 | 1433,91864 |
| <i>Reln</i> | 1,102685329 | 0,41003512 | 713,753189 | 787,04517 |
| <i>Cdc42</i> | 1,102349598 | 0,37728853 | 876,353768 | 966,048223 |
| <i>Cntnap2</i> | 1,099731569 | 0,42316046 | 714,809037 | 786,098064 |
| <i>Clcn2</i> | 1,073748773 | 0,539232 | 782,383303 | 840,083112 |
| <i>Gabrg2</i> | 1,068574473 | 0,44989651 | 1981,82653 | 2117,72924 |
| <i>Nsf</i> | 1,067007823 | 0,72748005 | 261,850282 | 279,3963 |
| <i>Cp</i> | 1,066947107 | 0,65758212 | 440,28858 | 469,764626 |
| <i>Slc6a1</i> | 1,062575931 | 0,43478844 | 3655,34547 | 3884,08212 |
| <i>Rilp</i> | 1,060102688 | 0,86567789 | 92,9146163 | 98,4990345 |
| <i>Grik1</i> | 1,052740864 | 0,84145444 | 152,042099 | 160,060931 |
| <i>Itpr1</i> | 1,048248184 | 0,55922148 | 2999,66392 | 3144,39226 |
| <i>Kctd7</i> | 1,04790884 | 0,88282908 | 112,975727 | 118,388263 |
| <i>Add1</i> | 1,042713664 | 0,58465295 | 4114,63932 | 4290,39064 |
| <i>Cacna1g</i> | 1,042370308 | 0,66147269 | 1524,64439 | 1589,24404 |
| <i>Becn1</i> | 1,039978136 | 0,73577886 | 821,449676 | 854,289703 |
| <i>Cacna1a</i> | 1,039642424 | 0,65814346 | 2045,17741 | 2126,2532 |
| <i>Adk</i> | 1,035932739 | 0,76547331 | 790,830087 | 819,246777 |
| <i>Syn1</i> | 1,028875316 | 0,83395549 | 581,7722 | 598,571056 |
| <i>Ache</i> | 1,028063743 | 0,7961358 | 1069,57394 | 1099,59018 |
| <i>Strada</i> | 1,023859861 | 0,92335655 | 209,057887 | 214,045979 |
| <i>Efhc1</i> | 1,013169531 | 0,97833725 | 146,76286 | 148,695658 |
| <i>Gabra1</i> | 1,01146686 | 0,87477726 | 6959,09359 | 7038,89254 |
| <i>Dlg4</i> | 1,00755697 | 0,92585101 | 3598,32969 | 3625,52216 |
| <i>Grin2b</i> | 1,005738448 | 1 | 69,6859622 | 70,0858515 |
| <i>Bche</i> | -1,005160899 | 1 | 174,214906 | 173,320417 |

| Gen | FC | p | Control | GASH:Sal |
|---------------------|--------------|------------|------------|------------|
| <i>Scarb2</i> | -1,00525267 | 0,94538111 | 5308,80331 | 5281,06362 |
| <i>Npy1r</i> | -1,005519245 | 1 | 97,138008 | 96,6048223 |
| <i>Abat</i> | -1,008375209 | 0,97009458 | 380,105249 | 376,948228 |
| <i>Charn4</i> | -1,013703704 | 0,9394769 | 412,836534 | 407,255623 |
| <i>Loc100763478</i> | -1,023991413 | 0,71844353 | 30569,9646 | 29853,7314 |
| <i>Gria1</i> | -1,027004059 | 0,80154676 | 1136,09235 | 1106,21993 |
| <i>Lgi1</i> | -1,029736842 | 0,74809975 | 1853,01309 | 1799,50159 |
| <i>Cacng3</i> | -1,033526235 | 0,84369239 | 375,881857 | 363,688743 |
| <i>Casp2</i> | -1,037931034 | 0,95777269 | 57,0157873 | 54,9321539 |
| <i>Kcnq2</i> | -1,050187869 | 0,63104871 | 1235,34206 | 1176,30578 |
| <i>Atp6ap2</i> | -1,05039455 | 0,56980177 | 2255,29114 | 2147,08953 |
| <i>Fyn</i> | -1,055658501 | 0,56720809 | 1582,71602 | 1499,26896 |
| <i>S100b</i> | -1,071883184 | 0,46115632 | 1608,05637 | 1500,21606 |
| <i>Chrn2</i> | -1,075796296 | 0,63762596 | 407,557294 | 378,84244 |
| <i>Scn1b</i> | -1,080583986 | 0,44654367 | 1233,23036 | 1141,26285 |
| <i>Cacnb4</i> | -1,087563786 | 0,45289375 | 927,034467 | 852,395491 |
| <i>Loc100737706</i> | -1,088888889 | 0,88309721 | 44,3456123 | 40,7255623 |
| <i>Gabbr3</i> | -1,093569598 | 0,40678372 | 1032,61926 | 944,264783 |
| <i>Prickle1</i> | -1,104237824 | 0,46610289 | 551,15261 | 499,124915 |
| <i>Gabrd</i> | -1,106432749 | 0,69902842 | 139,371924 | 125,965111 |
| <i>Pdyn</i> | -1,114814815 | 0,91846007 | 22,1728062 | 19,8892281 |
| <i>Pgf</i> | -1,114814815 | 1 | 1,05584791 | 0,9471061 |
| <i>Glud1</i> | -1,119153127 | 0,10896318 | 8988,43328 | 8031,45974 |
| <i>Htr7</i> | -1,124768519 | 0,67756374 | 119,310814 | 106,075883 |
| <i>Tbc1d24</i> | -1,131489395 | 0,38267866 | 501,527759 | 443,245655 |
| <i>Grm1</i> | -1,14339981 | 0,62248967 | 126,70175 | 110,811414 |
| <i>Abcb1b</i> | -1,146666667 | 0,81253231 | 38,0105249 | 33,1487135 |
| <i>Me2</i> | -1,171008732 | 0,20918461 | 682,077752 | 582,470252 |
| <i>Th</i> | -1,210475492 | 0,25172152 | 347,373963 | 286,973149 |
| <i>Kcnq3</i> | -1,305321144 | 0,22501315 | 195,331864 | 149,642764 |
| <i>Npy2r</i> | -1,393518519 | 0,81248235 | 10,5584791 | 7,57684881 |
| <i>Kcnma1</i> | -1,397234568 | 0,06685029 | 297,749111 | 213,098873 |
| <i>Crhbp</i> | -1,457834758 | 0,66293291 | 17,9494145 | 12,3123793 |
| <i>Mbp</i> | -6,317283951 | 0,07838077 | 17,9494145 | 2,8413183 |

Anexo 2. Lista de genes encontrados en la búsqueda “epilepsy”, entre los fenotipos asociados de la lista completa de expresión diferencial. Se encuentran ordenados según su valor de FC.

| Gen | FC | <i>p</i> | Control | GASH:Sal |
|---------------------|--------------|-----------------|----------------|-----------------|
| <i>Epm2a</i> | 1,146179402 | 0,50874155 | 190,052624 | 217,834403 |
| <i>Gabrg2</i> | 1,068574473 | 0,44989651 | 1981,82653 | 2117,72924 |
| <i>Gabra1</i> | 1,01146686 | 0,87477726 | 6959,09359 | 7038,89254 |
| <i>Optn</i> | -1,020433082 | 0,85845269 | 970,324232 | 950,894526 |
| <i>Atn1</i> | -1,026199301 | 0,79556291 | 1369,43474 | 1334,4725 |
| <i>Loc100737706</i> | -1,088888889 | 0,88309721 | 44,3456123 | 40,7255623 |
| <i>Scn9a</i> | -1,103554059 | 0,57276483 | 310,419286 | 281,290512 |
| <i>Cystatin-b</i> | -1,217091403 | 0,4698707 | 125,645902 | 103,234565 |

Anexo 3. Lista de genes encontrados en la búsqueda “*epilepsies*”, entre los fenotipos asociados de la lista completa de expresión diferencial. Se encuentran ordenados según su valor de FC.

| Gen | FC | <i>p</i> | Control | GASH:Sal |
|---------------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| <i>Il6r</i> | 2,332225914 | 0,459517612 | 5,279239564 | 12,31237931 |
| <i>Drd3</i> | 1,794019934 | 1 | 1,055847913 | 1,894212202 |
| <i>Ptgs2</i> | 1,644518272 | 0,703932984 | 6,335087476 | 10,41816711 |
| <i>Casp1</i> | 1,524916944 | 0,652246393 | 10,55847913 | 16,10080372 |
| <i>Ccnd1</i> | 1,432322366 | 0,264687187 | 65,46257059 | 93,76350401 |
| <i>Ncf2</i> | 1,409587091 | 0,663031037 | 14,78187078 | 20,83633422 |
| <i>Xrcc1</i> | 1,370431894 | 0,298588963 | 76,02104972 | 104,1816711 |
| <i>Tnfrsf1a</i> | 1,30474177 | 0,667974741 | 23,22865408 | 30,30739524 |
| <i>Dusp6</i> | 1,289080548 | 0,23617507 | 159,4330348 | 205,5220239 |
| <i>Aif1</i> | 1,28144281 | 0,780319632 | 14,78187078 | 18,94212202 |
| <i>Dusp1</i> | 1,279880075 | 0,150268042 | 259,7385865 | 332,4342415 |
| <i>Med17</i> | 1,252581485 | 0,212848001 | 234,3982366 | 293,6028913 |
| <i>Grm8</i> | 1,196013289 | 0,687554047 | 44,34561233 | 53,03794166 |
| <i>Wnt2</i> | 1,196013289 | 0,828508784 | 19,00526243 | 22,73054643 |
| <i>Abcc8</i> | 1,191530481 | 0,133701119 | 704,2505578 | 839,1360056 |
| <i>Plp1</i> | 1,189953462 | 0,007877543 | 32456,76484 | 38622,0397 |
| <i>Charn3</i> | 1,186046512 | 0,554561392 | 95,02631215 | 112,705626 |
| <i>Grik5</i> | 1,172534968 | 0,249776784 | 457,1821462 | 536,0620532 |
| <i>Apaf1</i> | 1,146179402 | 0,732884827 | 57,01578729 | 65,35032098 |
| <i>Prnt2</i> | 1,141453259 | 0,225947195 | 879,5213113 | 1003,932467 |
| <i>Npy</i> | 1,130845898 | 0,364235236 | 494,1368232 | 558,7925997 |
| <i>Sez6</i> | 1,11818247 | 0,222499211 | 1614,391459 | 1805,184229 |
| <i>Ywhab</i> | 1,095809897 | 0,217301909 | 4911,80449 | 5382,403973 |
| <i>Alad</i> | 1,085666825 | 0,650802459 | 266,073674 | 288,8673608 |
| <i>Tnfrsf1b</i> | 1,07641196 | 1 | 10,55847913 | 11,36527321 |
| <i>Gabrg2</i> | 1,068574473 | 0,449896508 | 1981,826532 | 2117,729242 |
| <i>Loc100752268</i> | 1,062886632 | 0,607484986 | 742,2610826 | 788,9393822 |
| <i>Pde4a</i> | 1,0530117 | 0,983788856 | 24,28450199 | 25,57186473 |
| <i>Rtn4</i> | 1,051703477 | 0,540940885 | 2675,518611 | 2813,852226 |
| <i>Eno2</i> | 1,04445283 | 0,531533202 | 9583,931504 | 10009,96438 |
| <i>Ywhaz</i> | 1,040079064 | 0,630474651 | 2846,565973 | 2960,653672 |
| <i>Camk2d</i> | 1,03528423 | 0,8595854 | 267,1295219 | 276,5549815 |
| <i>Aspm</i> | 1,0350115 | 1 | 13,72602287 | 14,20659152 |
| <i>Gja1</i> | 1,033740129 | 0,79844722 | 630,3412039 | 651,6089976 |
| <i>Gabbr1</i> | 1,02563539 | 0,729276912 | 5905,357376 | 6056,743517 |
| <i>Kcnj10</i> | 1,020554745 | 0,842694549 | 1264,905799 | 1290,905616 |
| <i>Ccnb1</i> | 1,016611296 | 1 | 15,83771869 | 16,10080372 |
| <i>Pld2</i> | 1,015669553 | 0,907839122 | 670,4634246 | 680,9692867 |
| <i>Kcnj11</i> | 1,013504768 | 0,997153956 | 81,30028928 | 82,3982308 |
| <i>Srebfl2</i> | 1,008072396 | 0,929208904 | 2225,7274 | 2243,694354 |
| <i>Pld1</i> | 1,007020623 | 1 | 111,9198787 | 112,705626 |
| <i>Npy1r</i> | -1,005519245 | 1 | 97,13800797 | 96,60482231 |
| <i>Syt4</i> | -1,005601608 | 0,961367611 | 1263,849952 | 1256,809796 |

| Gen | FC | <i>p</i> | Control | GASH:Sal |
|---------------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| <i>Scn2b</i> | -1,008590882 | 0,943593236 | 992,497038 | 984,0432391 |
| <i>Slc12a2</i> | -1,010139788 | 0,912137197 | 2068,406061 | 2047,643391 |
| <i>Il6st</i> | -1,010765432 | 0,925061483 | 1076,964871 | 1065,494364 |
| <i>Rrm1</i> | -1,016207116 | 0,928461064 | 391,7195756 | 385,4721832 |
| <i>Gad2</i> | -1,021481481 | 0,898047456 | 416,0040776 | 407,2556235 |
| <i>Gria1</i> | -1,027004059 | 0,801546757 | 1136,092354 | 1106,219926 |
| <i>Neur11</i> | -1,029059829 | 0,939793314 | 114,0315746 | 110,8114138 |
| <i>Ank</i> | -1,041019233 | 0,674526561 | 1534,147017 | 1473,697093 |
| <i>Apex1</i> | -1,044511178 | 0,803569161 | 329,4245488 | 315,3863317 |
| <i>Kcnq2</i> | -1,050187869 | 0,631048706 | 1235,342058 | 1176,305778 |
| <i>Nqo1</i> | -1,05482478 | 0,800759765 | 222,7839096 | 211,2046605 |
| <i>Nr3c1</i> | -1,060433604 | 0,653046484 | 617,6710289 | 582,4702522 |
| <i>Msh2</i> | -1,0651001 | 0,602531539 | 746,4844743 | 700,8585148 |
| <i>Mtap1b</i> | -1,070807696 | 0,302272396 | 23404,98068 | 21857,3146 |
| <i>S100b</i> | -1,071883184 | 0,461156319 | 1608,056371 | 1500,216064 |
| <i>Acp2</i> | -1,077773808 | 0,499074356 | 952,3748173 | 883,6499923 |
| <i>Gria2</i> | -1,079007058 | 0,59921114 | 477,2432566 | 442,2985492 |
| <i>Scn1b</i> | -1,080583986 | 0,446543668 | 1233,230362 | 1141,262852 |
| <i>Loc100737706</i> | -1,088888889 | 0,88309721 | 44,34561233 | 40,72556235 |
| <i>Pten</i> | -1,089453053 | 0,330928903 | 2086,355476 | 1915,048536 |
| <i>Ccr5</i> | -1,094907407 | 0,843288839 | 58,0716352 | 53,03794166 |
| <i>Vip</i> | -1,094907407 | 0,843288839 | 58,0716352 | 53,03794166 |
| <i>Slc6a11</i> | -1,095089437 | 0,196675432 | 8733,973934 | 7975,580478 |
| <i>Adarb1</i> | -1,098525878 | 0,305711 | 1780,159581 | 1620,498539 |
| <i>Glud1</i> | -1,119153127 | 0,108963178 | 8988,433281 | 8031,459737 |
| <i>Cit</i> | -1,146171066 | 0,136440046 | 1813,946714 | 1582,614295 |
| <i>Cplx2</i> | -1,183480945 | 0,335979083 | 309,3634384 | 261,4012839 |
| <i>Bad</i> | -1,197013142 | 0,355971274 | 246,0125637 | 205,5220239 |
| <i>Loc100760218</i> | -1,19739369 | 0,77963133 | 30,61958947 | 25,57186473 |
| <i>Smo</i> | -1,19739369 | 0,421714896 | 183,7175368 | 153,4311884 |
| <i>Cystatin-b</i> | -1,217091403 | 0,469870703 | 125,6459016 | 103,234565 |
| <i>Pcsk1</i> | -1,224363091 | 0,08911752 | 802,4444137 | 655,397422 |
| <i>Kcnq3</i> | -1,305321144 | 0,225013147 | 195,3318639 | 149,642764 |
| <i>Plau</i> | -1,309907407 | 0,55126565 | 49,6248519 | 37,88424404 |
| <i>Bag3</i> | -1,331932307 | 0,094379845 | 336,8154842 | 252,877329 |
| <i>Hrh3</i> | -1,490595089 | 0,151571858 | 125,6459016 | 84,292443 |
| <i>Npy5r</i> | -1,66036249 | 0,172888481 | 73,90935389 | 44,51398675 |
| <i>Gpr98</i> | -2,273347858 | 0,010727248 | 109,8081829 | 48,30241116 |
| <i>C7</i> | -5,016666667 | 0,095902215 | 19,00526243 | 3,788424404 |

Anexo 4. Lista de genes encontrados en la búsqueda “*seizure*”, entre los fenotipos asociados de la lista completa de expresión diferencial, ordenados según su valor de FC.

| Gen | FC | <i>p</i> | Control | GASH:Sal |
|-----------------|-------------|------------|------------|------------|
| <i>Depdc5</i> | 4,48504983 | 0,59325229 | 1,05584791 | 4,73553051 |
| <i>Charn2</i> | 1,75061623 | 0,06293346 | 65,4625706 | 114,599838 |
| <i>Sptan1</i> | 1,26396859 | 0,71510894 | 23,2286541 | 29,3602891 |
| <i>Sik1</i> | 1,19085806 | 0,39695238 | 183,717537 | 218,781509 |
| <i>Alg13</i> | 1,17732558 | 0,76399226 | 33,7871332 | 39,7784562 |
| <i>Mef2c</i> | 1,17117913 | 0,32719053 | 317,810222 | 372,212698 |
| <i>Snip1</i> | 1,15441283 | 0,57776483 | 121,42251 | 140,171703 |
| <i>Aldh7a1</i> | 1,15156685 | 0,30520347 | 468,796473 | 539,850478 |
| <i>Cdkl5</i> | 1,14699635 | 0,5029437 | 193,220168 | 221,622828 |
| <i>Cntnap2</i> | 1,09973157 | 0,42316046 | 714,809037 | 786,098064 |
| <i>Szt2</i> | 1,07943842 | 0,45494941 | 1126,58972 | 1216,08423 |
| <i>Kenc1</i> | 1,07766263 | 0,43908236 | 1363,09966 | 1468,96156 |
| <i>Kcnb1</i> | 1,07105668 | 0,70046692 | 282,967241 | 303,073952 |
| <i>Gabrg2</i> | 1,06857447 | 0,44989651 | 1981,82653 | 2117,72924 |
| <i>Slc6a1</i> | 1,06257593 | 0,43478844 | 3655,34547 | 3884,08212 |
| <i>Ier3ip1</i> | 1,05232265 | 0,77407399 | 298,804959 | 314,439226 |
| <i>Grin1</i> | 1,04660589 | 0,56470498 | 3349,14958 | 3505,23968 |
| <i>Epm2a</i> | 1,03072574 | 0,76897224 | 1189,9406 | 1226,5024 |
| <i>Syn1</i> | 1,02887532 | 0,83395549 | 581,7722 | 598,571056 |
| <i>Strada</i> | 1,02385986 | 0,92335655 | 209,057887 | 214,045979 |
| <i>Gabra1</i> | 1,01146686 | 0,87477726 | 6959,09359 | 7038,89254 |
| <i>Grin2b</i> | 1,00573845 | 1 | 69,6859622 | 70,0858515 |
| <i>Dnm1</i> | -1,00032789 | 0,99764711 | 8293,68535 | 8290,96681 |
| <i>Scarb2</i> | -1,00525267 | 0,94538111 | 5308,80331 | 5281,06362 |
| <i>Charn4</i> | -1,0137037 | 0,9394769 | 412,836534 | 407,255623 |
| <i>Slc35a2</i> | -1,02343655 | 0,89701154 | 354,764899 | 346,640833 |
| <i>Scn8a</i> | -1,02859878 | 0,74304553 | 2355,59669 | 2290,10255 |
| <i>Lgi1</i> | -1,02973684 | 0,74809975 | 1853,01309 | 1799,50159 |
| <i>Gnao1</i> | -1,03160701 | 0,71198136 | 2565,71043 | 2487,10062 |
| <i>Kcnq2</i> | -1,05018787 | 0,63104871 | 1235,34206 | 1176,30578 |
| <i>Arhgef9</i> | -1,05121069 | 0,55295586 | 2547,76101 | 2423,64451 |
| <i>Wwox</i> | -1,05985915 | 0,8300434 | 142,539468 | 134,489066 |
| <i>Prickle2</i> | -1,06439605 | 0,63577965 | 601,83331 | 565,422342 |
| <i>Chd2</i> | -1,06596534 | 0,52473636 | 1290,24615 | 1210,4016 |
| <i>Gabrb3</i> | -1,0935696 | 0,40678372 | 1032,61926 | 944,264783 |
| <i>Gosr2</i> | -1,0960258 | 0,68498509 | 184,773385 | 168,584886 |
| <i>Hcn1</i> | -1,09873575 | 0,46011422 | 649,346466 | 590,994207 |
| <i>Scn9a</i> | -1,10355406 | 0,57276483 | 310,419286 | 281,290512 |
| <i>Prickle1</i> | -1,10423782 | 0,46610289 | 551,15261 | 499,124915 |
| <i>Pnkp</i> | -1,10584848 | 0,52267578 | 390,663728 | 353,270576 |
| <i>Tbc1d24</i> | -1,1314894 | 0,38267866 | 501,527759 | 443,245655 |
| <i>St3gal3</i> | -1,13704272 | 0,30014863 | 702,138862 | 617,513178 |

| Gen | FC | <i>p</i> | Control | GASH:Sal |
|---------------|-------------|-----------------|----------------|-----------------|
| <i>Plcb1</i> | -1,14131858 | 0,28002209 | 727,479212 | 637,402406 |
| <i>Kcna2</i> | -1,16591049 | 0,09247657 | 1855,12478 | 1591,13825 |
| <i>Nhlrc1</i> | -1,19304743 | 0,65454324 | 64,4067227 | 53,9850478 |
| <i>Cln8</i> | -1,23717254 | 0,49685595 | 96,0821601 | 77,6627003 |
| <i>Kcnq3</i> | -1,30532114 | 0,22501315 | 195,331864 | 149,642764 |
| <i>Grin2a</i> | -1,39704641 | 0,11972266 | 209,057887 | 149,642764 |
| <i>Kcnma1</i> | -1,39723457 | 0,06685029 | 297,749111 | 213,098873 |
| <i>Arx</i> | | 0,63535221 | 0 | 2,8413183 |

Anexo 5. Lista de genes de la lista de expresión diferencial completa que coinciden con los señalados por la EGI en su lista de genes relacionados con la epilepsia, ordenados según su valor de FC.



Contents lists available at ScienceDirect

Epilepsy & Behavior

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

Overexpression of the immediate-early genes *Egr1*, *Egr2*, and *Egr3* in two strains of rodents susceptible to audiogenic seizures

D. López-López^{a,b}, R. Gómez-Nieto^{a,b,c}, M.J. Herrero-Turrión^a, N. García-Cairasco^d, D. Sánchez-Benito^{a,b}, M.D. Ludeña^c, D.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 Physiology Department, Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Revised 10 December 2015

Accepted 12 December 2015

Available online xxx

Keywords:

Audiogenic epilepsy

Early growth response

GASH:Sal

Seizure-induced transcriptome

Microarray

WAR

ABSTRACT

Genetic animal models of epilepsy are an important tool for further understanding the basic cellular mechanisms underlying epileptogenesis and for developing novel antiepileptic drugs. We conducted a comparative study of gene expression in the inferior colliculus, a nucleus that triggers audiogenic seizures, using two animal models, the Wistar audiogenic rat (WAR) and the genetic audiogenic seizure hamster (GASH:Sal). For this purpose, both models were exposed to high intensity auditory stimulation, and 60 min later, the inferior colliculi were collected. As controls, intact Wistar rats and Syrian hamsters were subjected to stimulation and tissue preparation protocols identical to those performed on the experimental animals. Ribonucleic acid was isolated, and microarray analysis comparing the stimulated Wistar and WAR rats showed that the genomic profile of these animals displayed significant (fold change, $|FC| \geq 2.0$ and $p < 0.05$) upregulation of 38 genes and downregulation of 47 genes. Comparison of gene expression profiles between stimulated control hamsters and stimulated GASH:Sal revealed the upregulation of 10 genes and the downregulation of 5 genes.

Among the common genes that were altered in both models, we identified the zinc finger immediate-early growth response gene *Egr3*. The *Egr3* protein is a transcription factor that is induced by distinct stress-elicited factors. Based on immunohistochemistry, this protein was expressed in the cochlear nucleus complex, the inferior colliculus, and the hippocampus of both animal models as well as in lymphoma tumors of the GASH:Sal. Our results support that the overexpression of the *Egr3* gene in both models might contribute to neuronal viability and development of lymphoma in response to stress associated with audiogenic seizures.

This article is part of a Special Issue entitled Genetic Models-Epilepsy.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Epilepsy is a complex neurological disorder in terms of both its etiology and its cognitive, behavioral, electrophysiological, molecular, and cellular pathology [1–3]. Although enormous progress has been made in understanding the etiology of epilepsy, the current knowledge is very limited. The complexity of this neurological disorder requires intense interdisciplinary research. Thus, at the moment, a variety of models are available for exploring different aspects of epilepsy such as *in silico* [4], *in vivo* [5], and *in vitro* [6].

Some *in vivo* models represent the natural association between genetic predisposition and external events that trigger seizures [7]. Among the most used and well-characterized *in vivo* genetic models of epilepsy are audiogenic seizures, which are triggered by high intensity acoustic stimulation. The substantial characterization of their neural substrates, as well as their behavioral, cellular, and molecular alterations, combined with pharmacologically- or electrically-induced seizures, potentiates their usefulness in the elucidation of epileptogenesis and preclinical development of new antiepileptic drugs [8,9].

The present study focused on two animal strains that are categorized as audiogenic seizure models, the Wistar audiogenic rat (WAR) and the genetic audiogenic seizure hamster (GASH:Sal).

The WAR is a genetically selected strain susceptible to audiogenic seizures that was inbred at the School of Medicine of Ribeirão Preto (Brazil) beginning in 1990. This strain is a model of audiogenic idiopathic epilepsy that develops tonic-clonic generalized seizures [10,11].

* Corresponding author at: Institute for Neuroscience of Castilla y León (INCYL), Laboratory 12, C/Pintor Fernando Gallego 1, 37007 Salamanca, Spain. Tel.: +34 923294400x1868.

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

The GASH:Sal, a hamster strain developed at the University of Salamanca, exhibits genetic audiogenic epilepsy similar to human tonic-clonic seizures [12]. The GASH:Sal shows an autosomal recessive inheritance for susceptibility to audiogenic seizures, which manifests more severely in young animals; the seizure severity progressively declines with age [13].

Similar to other animal models of audiogenic seizures [14–16], those with brainstem origin occur as a result of intense auditory stimulation [13,17]. Activation of auditory pathways is crucial for expression of the audiogenic seizure phenotype, and the inferior colliculus, in the auditory midbrain, plays a key role in its initiation [15,16]. Thus, bilateral lesions in the central nucleus of the IC permanently block audiogenic seizures [14,18–20], and lesions in the dorsal and external cortices of the IC partially attenuate the audiogenic seizures [14,21].

To find common molecular processes between these two models of audiogenic seizures, we have conducted a comparative analysis of the profiles of gene expression in the inferior colliculus (IC), a nucleus that triggers audiogenic seizures. Of all the possible comparisons, we have selected stimulated controls for comparison with the stimulated audiogenic strains, either GASH:Sal or WAR, to avoid bias related to sound-induced gene expression. Some of the deregulated genes detected via microarray analysis were validated by quantitative reverse transcription real-time PCR (RT-qPCR).

The present study might contribute toward understanding basic mechanisms associating genetic predisposition to epilepsy, early gene expression after seizures, and the recognition of new targets that could be consequently tested in the development of antiepileptic drugs.

Briefly, our results are important for the identification, in this particular case, of early genes induced by seizures and suggest molecular processes with potential implications for human epilepsy.

2. Material and methods

2.1. Experimental animals

A total of 51 animals were used in this study according to the following distribution: 17 male WAR and 6 male control rats (*Rattus norvegicus*, Wistar albino, Charles River Laboratories) at 12 weeks of age and a body weight of approximately 230 g. In the case of the hamsters, we used 12 control Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) and 16 GASH:Sal at 16 weeks of age, weighing approximately 60 g. The WAR and GASH:Sal animals did not suffer any audiogenic seizure prior to the experiments. All animals were free of ear infection. To rapidly confirm normal hearing, we used the bilateral finger friction test in all cases.

The animals were exposed to auditory stimulation within an acrylic cylinder. The acoustic stimulus was recorded using a high-pass filter (>500 Hz; microphone Bruel & Kjaer #4134 and preamplifier Bruel & Kjaer #2619), digitized above 4 kHz, and reproduced by a computer coupled to an amplifier (Fonestar MA-25T, Revilla de Camargo, Spain) and a tweeter (Beyma T2010, Valencia, Spain) in the upper portion of the arena. The delivered sound was a semirandom acoustic stimulus of 0–18 kHz with an intensity of 115 to 120 dB. For more information see [10,22]. Sixty minutes after the seizures, we harvested the IC for all gene expression analyses. As controls, normal Wistar rats and Syrian hamsters were exposed to the same stimulation according to the identical procedure.

For each gene microarray (Rat Gene 1.0 ST & Microarray MoGene 1.0 ST), the rats or hamsters were randomly divided into four groups, and we used the right and left inferior colliculi from each animal (Table 1). For the transcriptomic analyses, we compared only stimulated Syrian hamsters and stimulated GASH:Sal, using four animals of each strain. For RT-qPCR, 3 to 8 of the replicates from each group were randomly selected and performed in triplicate on two separate occasions for each gene product examined.

Table 1
Number of animals used in this study in the different experimental approaches.

| N | Microarray Rat Gene 1.0 ST | RT-qPCR | Histology | |
|-----------------------|----------------------------|---------|-----------|--|
| Wistar rat | 4 | 3 | N/A | |
| Stimulated Wistar rat | 3 | 3 | N/A | |
| WAR | 6 | 6 | 2 | |
| Stimulated WAR | 7 | 6 | 2 | |

| N | Microarray MoGene 1.0 ST | RT-qPCR | Histology | Transcriptome |
|---------------------------|--------------------------|-----------|-----------|---------------|
| Syrian hamster | 6 | 3 (6 LC.) | N/A | N/A |
| Stimulated Syrian hamster | 6 | 3 (6 LC.) | N/A | 4 (7 LC.) |
| GASH:Sal | 6 | 4 (8 LC.) | 2 | N/A |
| Stimulated GASH:Sal | 6 | 3 (6 LC.) | 2 | 4 (8 LC.) |

2.2. Ethics statement

All procedures and experimental protocols were performed according to the guidelines of the European Community's Council Directive (2010/63/CE) and Brazilian legislation for the care and use of laboratory animals.

The experiments were performed at both the Neuroscience Institute of Castilla y León at the University of Salamanca and the Ribeirão Preto School of Medicine at the University of São Paulo, with the approval of the Animal Care and Ethics Committees of those institutions.

2.3. Tissue sampling

After anesthetizing the animals with an overdose of sodium pentobarbital, the IC was isolated, surgically removed, and placed in TRIzol® (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) for transcription analysis. For immunohistological studies, the protocols used for tissue preparation, including perfusion of the animals, brain dissection, and tissue slicing, were identical to those used elsewhere [23,24].

2.4. RNA isolation

Total RNA was purified using TRIzol®, followed by further RNA purification using an RNeasy Mini Kit for RNA cleanup (Qiagen Sciences, Germantown, Maryland, USA). Ribonucleic acid quantity and quality were then assessed using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) to test the integrity of the 18S and 28S ribosomal RNA (rRNA) bands, and samples displaying an RNA integrity number (RIN) > 8.0 were used.

2.5. Microarray hybridization data analysis: normalization, differential gene expression, and ontological analysis

Microarray analysis was performed at the Cancer Research Center of Salamanca according to standard procedures. Labeling and hybridization were performed according to protocols from Affymetrix. Briefly, 100–300 ng of total RNA was amplified and labeled using the WT Sense Target labeling and control reagents kit (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA) and was then hybridized to rat (Gene 1.0 ST Array) or mouse (GeneChip® Mouse Gene ST Array) microarrays, as appropriate. Washing and scanning were performed using the Affymetrix GeneChip system (GeneChip Hybridization Oven 640, GeneChip Fluidics Station 450, and GeneChip Scanner 7G).

Following image analysis, the microarray data were imported into GeneSpring GX7.3 (Agilent Technologies). The robust multiarray analysis (RMA) algorithm [25] was used for background correction and normalization of fluorescent hybridization signals of the microarrays at both the internal (intramicroarrays) and the comparative (intermicroarrays) levels. This algorithm was selected over other

available algorithms such as the MAS5 or MBEI [26] because it was deemed to provide the best precision in signal detection to achieve adequate multiple-chip normalization [27], especially in cases of low-level gene expression [25,28,29], by producing efficient quantile normalization of the distribution of probe intensities from each array in the context of a complete set of arrays.

We used Bioconductor and R as computational tools (www.bioconductor.org) to apply RMA to the dataset of microarray hybridizations including 3 to 6 different biological replicates corresponding to each of the experimental groups in the study (Wistar rat or Syrian hamster control, stimulated Wistar rat or Syrian hamster, WAR or GASH:Sal control, and stimulated WAR or GASH:Sal).

After quantitation of the expression level of each probe set in all analyzed Rat Gene 1.0 ST microarrays, the significance analysis of microarrays (SAM) algorithm [30] was used to identify probe sets displaying significant differential expression when comparing the experimental samples to their controls. This algorithm performs statistical discrimination analysis using permutations to check the stability of variables fulfilling the 'alternative hypothesis'. This method calculates the type I error, or the number of expected false positives, by calculating the false discovery rate (FDR) [31]. In this report, genes displaying an FDR of 6% or less were considered as significant. We selected the genes that vary in a range (fold change, |FC| ≥ 2) among other genes and used different databases to determine their function.

In the case of the MoGene 1.0 ST microarrays, we compared the experimental groups corresponding to the stimulated hamster control and the stimulated GASH:Sal; all of our samples passed a stringent data quality control test and showed high intragroup homogeneity [32].

Potential differential expression was determined via one-way analysis of variance (ANOVA) (variances not assumed to be equal). Subsequently, an unpaired *t*-test ($p < 0.05$, filtered at 1.5 fold) was performed to search for the genes exhibiting differential expression (the levels in the control samples were considered as the basal levels) [32].

The data obtained and discussed in this publication have been deposited in the NCBI's Gene Expression Omnibus [33] at GEO Series accession numbers GSE74150 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE74150>) for the WAR arrays and GSE74043 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE74043>) for the GASH:Sal arrays.

Further processing, including functional analysis and overrepresentation calculations based on the Gene Ontology (GO) Annotation Tool and published data from the Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery, was performed using GeneSpring GX 7.3 and DAVID Bioinformatics Resources 6.7 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) [34].

2.6. Transcriptome of the inferior colliculus, RNASeq library generation, sequencing, and bioinformatic analysis

The analysis was performed using 15 biological samples of the left or right IC, which were obtained from male GASH:Sal and control hamsters (HdsHan@:AURA). Specifically, 8 IC samples were obtained from the controls (4 from the left and 4 from the right IC), and 7 IC samples were obtained from GASH:Sal (4 from the left and 3 from the right IC).

The pool of isolated and precipitated RNAs was generated using 3 samples from each animal type, taking 1 µg of RNA from each animal, and 3 µg of the pooled RNA was used for the creation of RNASeq libraries using the TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 (Illumina) after the removal of rRNA. Both obtained libraries were validated using the 2100 Agilent Bioanalyzer and were quantified via RT-qPCR analysis.

Sequencing of both libraries was conducted using an Ilx genome analyzer (Illumina) using the single read format, and the sequences that did not meet the purity criteria in the software were discarded. Quality values were associated with a value of 30 or greater on the Phred scale (0–40) for 25066143 reads PF (pass filter) considering a medium length

of 76 bp from the controls and 27848979 reads PF considering the same medium length from GASH:Sal.

After quality control, normalization of the libraries, and detection of no significant deviation between the differential expression and the average expression, we began analyzing the great quantity of data obtained. One of the most interesting means of analysis is the examination of the table containing all of the information about the differentially expressed genes. This information not only provides the biological processes, molecular functions, cellular components, and phenotypes associated with many genes according to their annotation but also describes whether the genes are upregulated or downregulated [FC] and whether the results from a statistical perspective were significant (p value).

The data obtained and discussed in this publication have also been deposited in the NCBI BioProject at accession number 230618.

2.7. Quantitative reverse transcription real-time PCR (RT-qPCR)

Total RNA (2 µg), reacted with oligo-dT and random hexamer primers, was reverse transcribed into cDNA at 37 °C for 2 h using the First Strand cDNA Synthesis Kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA). In all cases, a reverse transcriptase negative control was used to test genomic DNA contamination.

Quantitative RT-qPCR was performed using the SYBR Green method with a 2 × Master Mix (Applied Biosystems). Each reaction contained 10 µl of Master Mix, 0.4 µl of each pair of primers, 3 µl of each cDNA sample in a different serial cDNA quantity for each gene, and MilliQ water up to 20 µl. The amplification reaction was performed in an ABI Prism 7000 detection system (Applied Biosystems) under the following conditions: 10 min at 95 °C followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C depending on each pair of primers. Quantitative reverse transcription real-time PCR experiments were performed in replicates of 3 to 8 samples and conducted in triplicate for each gene product examined. The list of primers used is provided in Table 2. β-actin was used as the housekeeping gene.

To choose the most stable genes as internal references for RT-qPCR data normalization, two candidates [β-actin and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*)] were selected according to their expression levels detected in the microarray studied. The expression of these two genes was also measured by RT-qPCR. NormFinder software [35] was used to calculate the intra- and intergroup variations in gene expression. Our results indicated that β-actin is the most stable gene, whereas *Gapdh* is less stable (data not shown). Thus, the mean threshold cycle (Ct) value and primer efficiency value of β-actin were used for normalization.

The comparative Ct method was used for presenting quantitative data [36]. Following the removal of outliers [37], raw fluorescence data were used to determine the PCR amplification efficiency (E) according to the formula $E = [10^{(-1/\text{slope})} - 1] \times 100$. All amplifications had an E value of 100 ± 10%, and an E value near 100% indicated efficient amplification. The relative gene expression value (FC) for each transcript was calculated according to the formula $2^{-(\Delta\text{Ct} \text{ "condition 1"} - \Delta\text{Ct} \text{ "condition 2"})}$, where "condition 1" corresponds to the experimental sample, "condition 2" to the sample from the control animal, and ΔCt of each "condition" is $\text{Ct}_{\text{experimental gene}} - \text{Ct}_{\text{endogenous gene}}$ [36]. The standard error for each relative gene expression value was calculated as a measure of data variation. The significance of the qPCR analysis results was determined using a one-tailed *t*-test for each gene, considering |FC| > 1 as significant ($p < 0.05$).

2.8. Immunostaining

The control animals and the animals exposed to auditory stimulation of both species were euthanized with pentobarbital (60 mg/kg) and perfused transcardially with 0.9% saline wash solution followed by 4% paraformaldehyde fixative solution (Table 1). The time between audiogenic stimulation and sacrifice was 60 min. After the fixative perfusion,

Table 2
Oligonucleotide primers employed.

| Target protein | GenBank number ^a | Primer forward | cDNA forward ^a | Primer reverse | cDNA reverse ^a | Size of products | E ^b |
|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|---------------------------|-----------------------|---------------------------|------------------|----------------|
| Egr1 | NM_012551.2] | CAGC(A/G)GCGC(T/C)TTCAATCCTC | 162–181 | GTGGTCAGGTGCTCGTAGGG | 202–221 | 60 | 2.04 |
| | <i>Rattus norvegicus</i> | | 502–521 | | 542–561 | | |
| | XM_005065288.1] | | 265–284 | | 305–324 | | |
| | <i>Mesocricetus auratus</i> | | | | | | |
| Egr2 | XM_003515916.1] | AGGCCCTTGGATCTCCATA | 31–50 | CAGCTGGCACCAGGGTACTG | 127–146 | 116 | 2.00 |
| | <i>Cricetulus griseus</i> | | 347–363 | | 443–462 | | |
| | XM_005070807.1] | | 559–575 | | 655–674 | | |
| | <i>Mesocricetus auratus</i> | | 27–46 | | 123–142 | | |
| | AB264614.1] | | 1198–1217 | | 1253–1273 | | |
| Egr3 | XM_006252240.1] | CCACAAGCCCTTCAGTGTC | 1019–1038 | GTGCGGATGTGAGTGGTGAG | 1074–1094 | 75 | 1.98 |
| | <i>Rattus norvegicus</i> | | 789–808 | | 844–860 | | |
| | XM_006252239.1] | | 955–975 | | 1010–1026 | | |
| | <i>Rattus norvegicus</i> | | 1154–1173 | | 1209–1225 | | |
| | XM_005071015.1] | | 780–799 | | 835–855 | | |
| | <i>Mesocricetus auratus</i> | | | | | | |
| | XM_005071014.1] | | | | | | |
| | <i>Rattus norvegicus</i> | | | | | | |
| | XM_005071013.1] | | | | | | |
| | <i>Mesocricetus auratus</i> | | | | | | |
| Gabra4 | XM_008770135.1] | CACCAT(A/C)AGTGCGGAGTGTC | 1276–1295 | ATTTCAAAGGGCAGGCATGA | 1327–1346 | 71 | 1.98 |
| | <i>Rattus norvegicus</i> | | 498–517 | | 549–568 | | |
| | XM_003507783.2] | | 498–517 | | 549–568 | | |
| | <i>Rattus norvegicus</i> | | 441–460 | | 492–511 | | |
| | XM_007634147.1] | | 441–460 | | 492–511 | | |
| | <i>Rattus norvegicus</i> | | 605–624 | | 656–675 | | |
| | XM_007634149.1] | | 441–460 | | 492–511 | | |
| | <i>Rattus norvegicus</i> | | 441–460 | | 492–511 | | |
| | XM_007634150.1] | | | | | | |
| | <i>Rattus norvegicus</i> | | | | | | |
| Gapdh | NM_017008.4] | ACATGCCGCCTGGAGAAACCT | 805–824 | GCCCAGGATGCCCTTTAGTGG | 874–894 | 90 | 2.00 |
| | <i>Rattus norvegicus</i> | | 802–821 | | 871–891 | | |
| | NM_001244854.2] | | | | | | |
| β-actin | XM_006248886.1] | AGCCATGTACGTAGCCATCC | 240–259 | ACCCTCATAGATGGGCACAG | 335–354 | 115 | 2.03 |
| | <i>Rattus norvegicus</i> | | 415–434 | | 510–529 | | |
| | XM_006248885.1] | | 489–506 | | 584–602 | | |
| | <i>Rattus norvegicus</i> | | 390–407 | | 485–503 | | |
| | <i>Cricetulus griseus</i> | | | | | | |
| NM_001281595.1] | | | | | | | |
| <i>Mesocricetus auratus</i> | | | | | | | |

^a The primer location in the corresponding GenBank sequences of rat and hamster origin is indicated.^b qPCR primer efficiency (E) was calculated according to the following equation: $E = 10^{(-1/\text{slope})}$.

the brains were removed from the skulls and cryoprotected for 48 h at 4 °C in 30% sucrose in phosphate buffer (PB). Coronal brain sections at 40-μm thickness were generated using a freezing sliding microtome. All sections were processed for immunohistochemistry using similar procedures to those used in our previous studies of rats [24] and hamsters [23]. Briefly, the sections were washed and incubated in a rabbit anti-EGR3 primary antibody solution (1:500, #HPA006206, Sigma-Aldrich) diluted in TBS (Tris-buffered saline) for 24 h at 4 °C. The tissue was then washed and incubated with a goat biotinylated secondary antibody anti-rabbit (1:200, #BA-1000, Vector Labs) for 2 h at room temperature and finally visualized with the avidin–biotin–peroxidase complex procedure (Vectastain, Vector Labs) and histochemistry for peroxidase without heavy metal intensification. For each brain, all sections were mounted on slides, dehydrated, and coverslipped. Brain specimens taken from control animals, as well as from WAR and GASH:Sal animals, were processed simultaneously using the same batch of solutions and incubation times in order to minimize the variability in the visualization of immunoreactivity and DAB reaction product. For immunolocalization of markers in the lymphoma-derived tissue samples, the fixed tissues were processed in a commercial histological processor (Technicon, Assens Llofriu, Madrid, Spain), and the resulting paraffin blocks were cut into 3-μm sections. We used a Bond Polymer Refine Detection system (DS9800, Vision BioSystems, Newcastle, UK) (Leica Bond III), which included a polymeric horseradish peroxidase (HRP)-linked antibody for the detection of the secondary antibody,

according to the instructions of the manufacturer using the same concentration as cited above.

The primary antibody used was anti-Egr3 (1:500, #HPA006206, Sigma-Aldrich), a polyclonal antibody generated in rabbits against the recombinant early growth response 3 protein epitope signature tag (PreST) (see details in the manufacturer's technical information).

Negative controls were not treated with primary antibodies, and this resulted in the complete absence of immunolabeling.

The histological sections were thoroughly examined under a microscope (DMBL, Leica), and images were captured using a digital camera (DP50, Olympus) adapted to the microscope.

3. Results

3.1. Microarray analysis

3.1.1. Gene expression arrays of the IC in the control vs. GASH:Sal hamsters after acoustic stimulation

From the full list of genetic analyses obtained from the MoGene 1.0 ST expression arrays of all samples, the analysis of sound-stimulated control hamsters and GASH:Sal was composed of 28,814 entries (26,293 of which were identifiable). The differences between the stimulated controls and stimulated GASH:Sal were analyzed. We identified a total of 82 genes that changed in expression when comparing stimulated controls to stimulated GASH:Sal (see complete list of differentially

expressed genes in Supplemental File 1). Of these 82 genes, we specifically identified 15 genes showing significant fold change ($|FC| \geq 1.5$) differences in gene expression. Thus, we found upregulation of 10 genes and downregulation of 5 genes in the stimulated GASH:Sal compared to stimulated control hamsters.

No relationships at the metabolic, structural, or functional level among the 15 genes were observed. Most of the genes were transcription factors (early growth response 2 [*Egr2*], early growth response 3 [*Egr3*], neuronal PAS domain protein 4 [*Npas4*], RAS protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 2 [*Rasgrf2*], sterile alpha motif domain-containing 9-like [*Samd9l*]), some of which were related to signaling pathways associated with Rho or Ras proteins (*Rasgrf2*, *Samd9l*). There were also genes related to calcium ion metabolism (ATPase, Ca^{++} transporting, ubiquitous [*Atp2a3*], triadin [*Trdn*]), epigenesis (jumonji, AT-rich interactive domain 1D [*Jarid1d*], ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat gene, Y chromosome [*Uty*]), translation processes (prostaglandin E synthase 3 (cytosolic)-like [*Ptges3l*]), or several biological processes (ADP-ribosylation factor-like 15 [*Arh15*], calcyclin-binding protein [*Cacybp*], cyclic nucleotide-binding domain-containing 1 [*Cnbd1*]). Interestingly, two of the genes encode transcription factors that belong to the family of early growth response genes, *Egr2* and

Egr3. The Gene Ontology (GO) annotations related to those genes include sequence-specific DNA binding transcription factor activity and transcription regulatory region DNA binding.

The functional analysis and overrepresentation calculations based on the GO Annotation Tool are shown in Fig. 1A.

3.1.2. Gene expression arrays of the IC in the Wistar vs. WAR rats after acoustic stimulation

Analysis of the differential expression between samples of the IC from stimulated Wistar and WAR rats provided a list of 297 genes. We reduced that list by choosing the most representative genes according to a cutoff absolute fold change of 2 or greater ($|FC| \geq 2$).

Comparative analysis of the microarray results between sound-stimulated Wistar and WAR rats showed that the genomic profile of these animals was significantly affected (displaying a $|FC| \geq 2$ and $p < 0.05$) in 39 upregulated genes and 32 downregulated genes.

To enhance the biological interpretation of the differentially expressed genes from our microarray studies, we determined whether any of the biological processes or molecular functions were overrepresented among the differentially expressed genes. The functional interpretation of the experimental data in the rat microarrays was performed using the GO

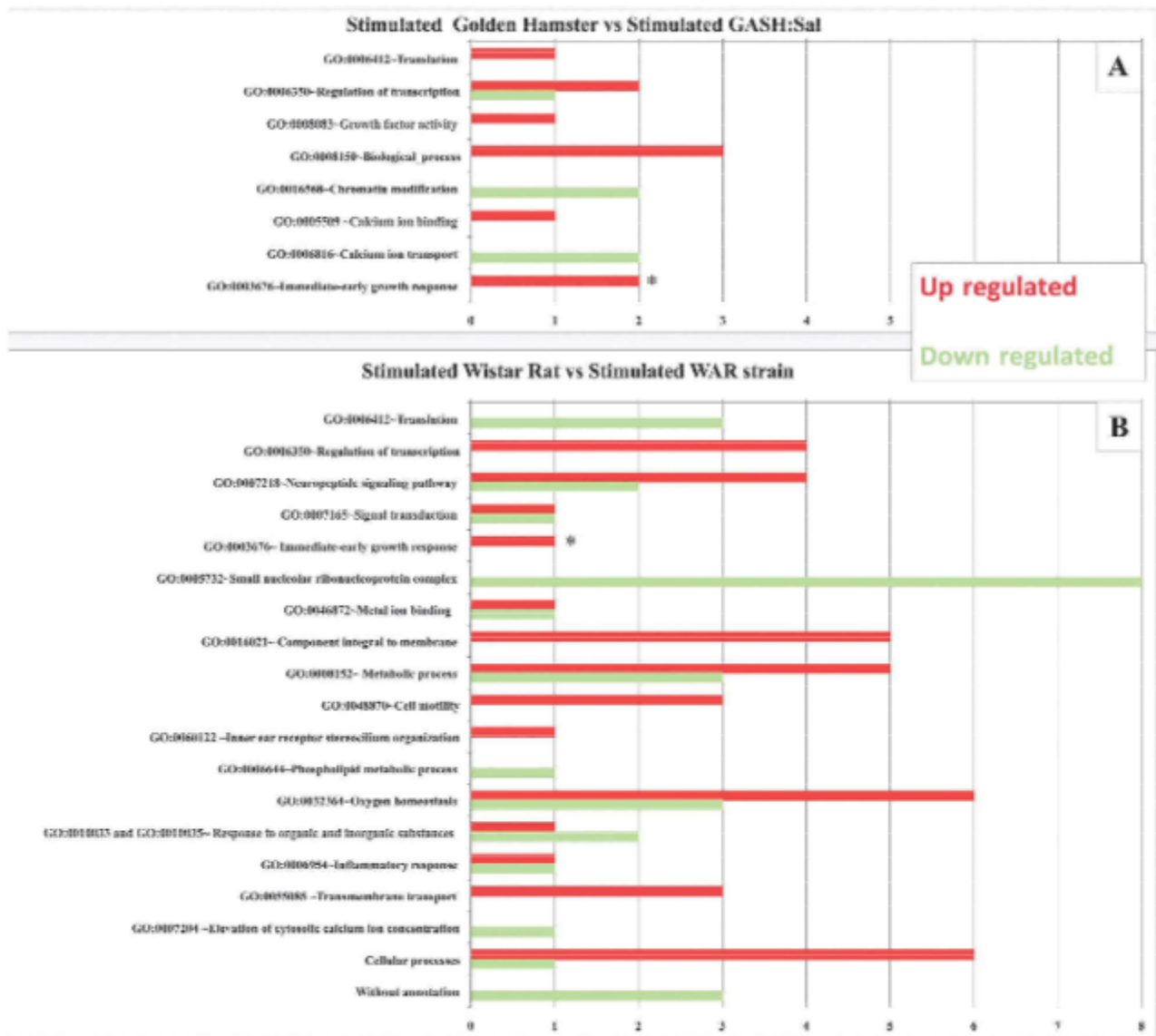


Fig. 1. Functional analysis of the genes in the most representative functional categories based on the Gene Ontology (GO) annotation. The bar graph shows the number of genes up- and downregulated in the IC after sound stimulation in the GASH:Sal (A) and WAR (B) models relative to their respective controls subjected to the same experimental conditions.

annotations (Fig. 1B). Our results indicated that although there were many overrepresented biological function categories, the majority of genes were related to a few function categories. We found certain functions that only corresponded to upregulated genes and other functions that corresponded to only downregulated genes or both up- and down-regulated genes (Fig. 1B). In our study, the most relevant function categories included genes involved in responses to different stimuli (epoxide hydrolase 2, cytoplasmic [*Ephx2*], regulator of G-protein signaling 2 [*Rgs2*], regulator of G-protein signaling 5 [*Rgs5*], succinate receptor 1 [*Sucnr1*]), oxygen homeostasis (ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1 [*Abcb1a*], lecithin-cholesterol acyl-transferase [*Lcat*], farnesyl diphosphate synthetase [*Fdps*]), metabolic process (DOPA decarboxylase [*Ddc*], phospholysine phosphohistidine inorganic pyrophosphate phosphatase [*Lhpp*], phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1 [*Prps1*], transthyretin [*Ttr*]), translation process (60S ribosomal protein L12 [*LOC499782*]), transcription factors (nitric oxide synthase trafficking [*Nostrin*], polymerase (RNA) III (DNA-directed) polypeptide K [*Polr3k*], SCAN domain-containing 1 [*Scand1*], U2 spliceosomal RNA [*U2*]), neuropeptide signaling pathway (EGF, latrophilin and seven transmembrane domain-containing protein 1 precursor [*ADGRF5*], adhesion G-protein-coupled receptor F5 [*Gpr116*], G-protein-coupled receptor 126 gene [*Gpr126*], 5-hydroxytryptamine receptor 3A [*Htr3a*], neuropeptide Y precursor [*NPY*], tachykinin, precursor 1 [*Tac1*]), calcium metabolism (mitochondrial fission 1 protein [*Fis1*]), and immediate-early growth response (*Egr3*), among other categories (Fig. 1B). Supplemental File 1 shows the complete list of differentially expressed genes.

The comparison between the gene expression profiles of the two seizure animal models using the microarray data showed only one common gene, the *Egr3*, which was upregulated in both cases.

3.2. Quantitative reverse transcription real-time PCR

We performed RT-qPCR analyses to validate the data obtained in the microarrays of the IC corresponding to the sound-stimulated audiogenic strains and their sound-stimulated controls. This included the overexpression of the *Egr3* in the experimental samples compared to the controls for both microarrays used in the present study. Moreover, we checked the expression of other deregulated genes in our microarrays and those belonging to the *Egr* family (*Egr1* and *Egr2*). The results of this set of experiments are shown in Fig. 2 and Table 3.

The three early growth response genes *Egr1*, *Egr2*, and *Egr3* were significantly overexpressed in both stimulated GASH:Sal and WAR compared to their respective stimulated controls (Fig. 2A and B). The value of *Egr3* and *Egr2* expression between stimulated Wistar and WAR rats was extraordinarily high (Fig. 2B), 10 fold higher than that observed for the comparison between stimulated control and GASH:Sal hamsters (Fig. 2A).

Furthermore, we determined the effect of sound stimulation in the IC gene expression, analyzing the expression of the *Egr* genes in the two strains with or without auditory stimulation by RT-qPCR. Thus, the gene expression of the IC in the baseline controls was compared with that in the sound-stimulated audiogenic strains (Fig. 2C and D).

The comparison of gene expression between nonstimulated GASH:Sal and stimulated GASH:Sal indicated that the expression of the three *Egr* genes was significantly higher in the stimulated GASH:Sal (100 fold higher than in the nonstimulated GASH:Sal) (Fig. 2C).

By comparing the nonstimulated WAR with the stimulated WAR, we found that the three *Egr* genes were significantly overexpressed in the stimulated WAR (Fig. 2D). The *Egr1* and *Egr3* expression results were similar to those found in the comparison of the GASH:Sal; alternatively,

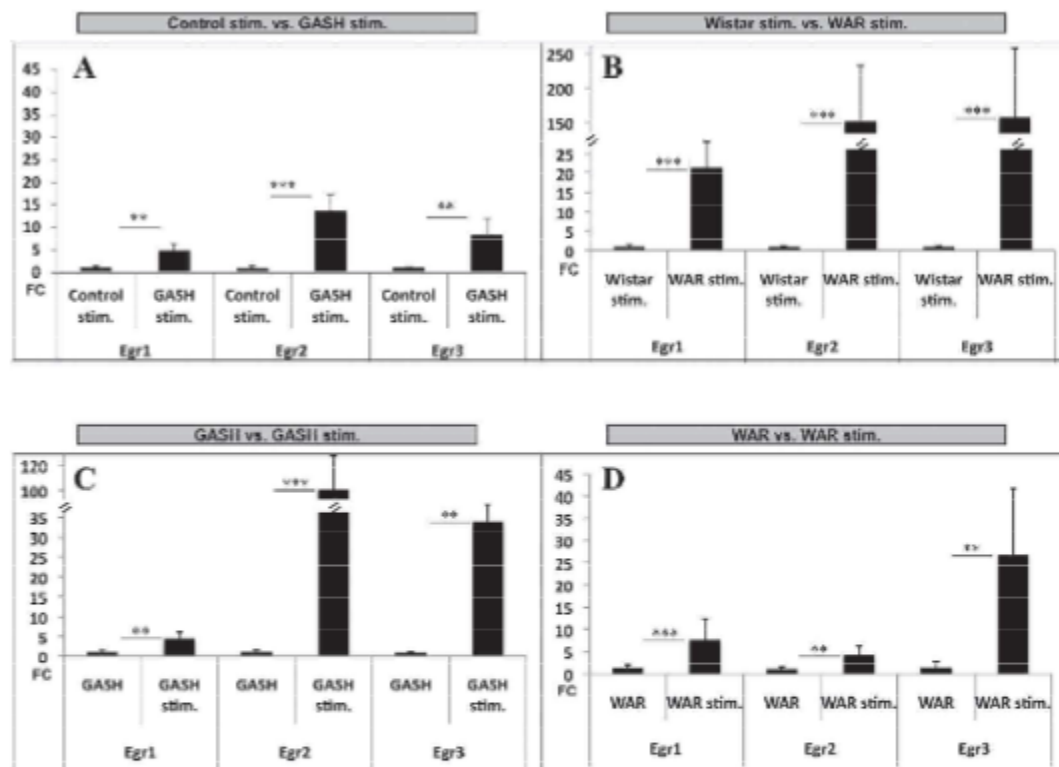


Fig. 2. The fold changes in *Egr* transcript expression in the IC of GASH:Sal and WAR models and their respective controls were measured via RT-qPCR. The expression of the three *Egr* genes was significantly increased in both audiogenic seizure models in comparison to their respective stimulated controls and in comparison with their basal levels. Error bars indicate hemistandard deviation (SD). The housekeeping gene used was β -actin. All the RT-qPCR primers are described in Table 1. Significant differences are indicated as $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***). Abbreviation: FC, fold change (relative mRNA levels).

Table 3

The fold changes in GABRA4 transcript expression in the IC of the GASH:Sal and WAR models and their respective controls were measured via RT-qPCR. In red, upregulated; in green, downregulated. The housekeeping gene used was β -actin. All the RT-qPCR primers are described in Table 1. The significant differences are indicated as $p < 0.001$ (***); NS, not significant ($p > 0.05$).

| Gene description | Gene symbol | Control stim. vs. GASH stim. | | RT-qPCR p value | GASH vs. GASH stim. | | RT-qPCR p value |
|--|---------------|------------------------------|-----------------|-----------------|---------------------|-----------------|-----------------|
| | | RT-qPCR | | | RT-qPCR | | |
| | | Control stim. | GASH stim. | | GASH | GASH stim. | |
| Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor α 4 subunit | GABRA4 | 1.02 \pm 0.27 | 0.79 \pm 0.20 | NS | 1.10 \pm 0.39 | 0.94 \pm 0.24 | NS |

| Gene description | Gene symbol | Wistar stim. vs. WAR stim. | | RT-qPCR p value | WAR vs. WAR stim. | | RT-qPCR p value |
|--|---------------|----------------------------|-----------------|-----------------|-------------------|-----------------|-----------------|
| | | RT-qPCR | | | RT-qPCR | | |
| | | Wistar stim. | WAR stim. | | WAR | WAR stim. | |
| Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor α 4 subunit | GABRA4 | 1.01 \pm 0.19 | 4.56 \pm 1.29 | < 0.001 (***) | 1.13 \pm 0.70 | 1.42 \pm 0.89 | NS |

Egr2 expression was slightly higher in the stimulated WAR than in the nonstimulated WAR, although not to the extent observed in GASH:Sal.

Finally, we performed RT-qPCR analysis on other genes related to the function of the *Egr3*, such as the gene encoding the gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 4 (*GABRA4*), despite not having been detected as deregulated in our microarray analysis. In our study, the expression of the gene encoding the alpha 4 subunit of GABA A receptor was not significantly changed in the IC of the GASH:Sal under any of the conditions studied (Fig. 2A and C). Alternatively, *GABRA4* expression was significantly different in the IC of the sound-stimulated WAR compared to the sound-stimulated controls (Table 3).

3.3. Immunohistochemistry

Since *Egr3* was upregulated in the IC of both audiogenic strains, we studied the distribution of the *Egr3* protein in the nervous system under basal conditions and after sound stimulation. Using immunohistochemistry to detect *Egr3*, we found a similar immunostaining pattern between the two species (Figs. 3 and 4). Early growth response 3 immunopositive neurons were found in the auditory pathway of the stimulated animals and nonstimulated animals. In WAR and GASH:Sal animals, *Egr3* immunolabeled neurons were present in all the three divisions of the IC. The majority of *Egr3* immunolabeled neurons were found in the dorsal and external cortices of the IC, while weakly stained neurons were found in the central nucleus of the IC (Figs. 3 and 4). Also, *Egr3* immunostaining was present in the cochlear nucleus complex (Figs. 3 and 4). Outside the auditory pathway, we found *Egr3* immunoreactivity in the hippocampus (Figs. 3 and 4).

Because of the close relationship between *Egr3* expression and the proliferation of B and T lymphocytes [38], we examined the presence of this protein in lymphoma cells sporadically observed in the colony of GASH:Sal [39]. We found immunoreactivity for the *Egr3* protein in Burkitt-type non-Hodgkin neoplastic lymphoma tissue, which was previously observed in the GASH:Sal [39]. Early growth response 3 immunostaining revealed focal expression in the lymphoid cells localized to the cytoplasm (Fig. 5).

3.4. Transcriptome comparison

We used the mouse probes for the microarray analyses of gene expression in hamsters as the Syrian hamster probes were not currently available. To confirm these results, we employed Chinese hamster

probes (*Cricetulus griseus*) via transcriptomic analysis, comparing the stimulated controls with the stimulated GASH:Sal. The data are available in a database at NCBI under the project number PRJNA230618 (<https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/ft/byid/bq7rg36z/gashsubmission.sqn>). Upon using these probes, the number of differentially expressed genes between stimulated GASH:Sal and the stimulated controls was increased. In the present study, we focused only on the results related to the *Egr* genes. The expression values from RT-qPCR and transcriptomic analyses showed significantly increased values of the early expression genes *Egr1*, *Egr2*, and *Egr3*. In the microarray analysis, we found upregulation of the *Egr2* and *Egr3* genes, but we did not detect upregulation of the *Egr1* (Fig. 6).

4. Discussion

Genetic animal models of epilepsy provide important tools for further understanding the basic cellular mechanisms underlying epileptogenesis and identifying new targets for antiepileptic drugs. They are also used to determine the genetic factors that induce seizures to discover molecular mechanisms in common with human epilepsy.

In the present study, using microarrays, we analyzed the changes in gene expression in two strains with audiogenic epilepsy after a seizure event, compared with controls under the same conditions. The comparison of the gene expression profiles between the two animal models using the microarray data showed only one common gene, *Egr3*, which was upregulated in both cases. On the other hand, using RT-qPCR studies, we confirmed the differential expression of this gene and two other early response genes, *Egr1* and *Egr2*, which were also upregulated in both species. Differences between microarray and RT-qPCR data occur for several reasons, including the fact that different probes are used for the microarray and RT-qPCR experiments (which can capture differential expression in splice variants), differences in the methods for normalization of expression data, and possible false-positive expression changes. In addition, lower correlations between RT-qPCR and microarray results were consistently reported for genes exhibiting small degrees of changes [40].

4.1. Methodological considerations

In our study, the time between the induced seizures and the tissue sampling for the RNA study was 60 min. Since it has been reported that the expression of *Egr2* and *Egr3* is dramatically induced 30 min

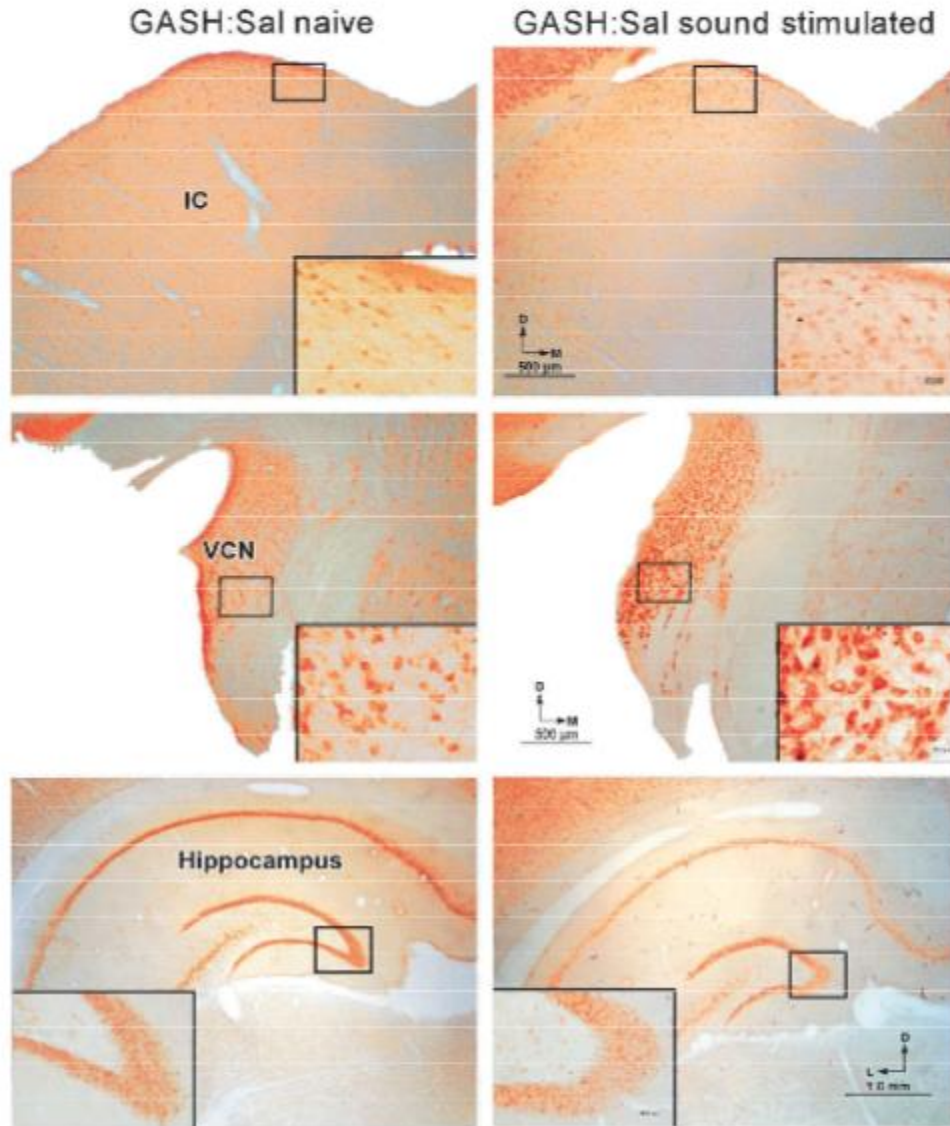


Fig. 3. Coronal sections of GASH:Sal were immunostained to visualize Egr3 protein expression. The inset shows a magnification of the boxed area. Abbreviations: IC, inferior colliculus; VCN, ventral cochlear nucleus.

after the onset of seizures induced by kainic acid [41], we set 60 min as a period of time sufficient to detect *Egr* gene expression. Microarray analysis enables global transcriptomic studies of the changes in gene expression because it enables the simultaneous analysis of thousands of genes in a single experiment. Briefly, after performing the hybridization arrays and after quantitation of the expression level of each probe set in all microarrays, we used a different algorithm to identify probe sets displaying significant differential expression by comparing the samples from audiogenic strains with their respective controls. We selected the genes that varied in a range (fold change) among other genes and used different databases to identify their function. Only genes displaying a $|FC| > 2$ (up- or downregulated) were considered for analysis. For the GASH:Sal, we have chosen a less restrictive criterion, $|FC| > 1.5$, because the probes used were not the most appropriate and did not allow us to detect many changes. Moreover, because a limited number of genes were differentially expressed, few genes fulfilled such a restrictive criterion. On the other hand, we used commercial mouse microarrays to study gene expression in hamsters because the genome of this species has not been described, and therefore, no specific arrays have been developed. Furthermore, it is well known that these two species (*M. auratus* and *Mus musculus*) are phylogenetically very close [42].

Genotyping of *M. auratus* is currently underway at the Broad Institute (NCBI-BioProject accession: PRJNA77669) but is not published yet. Therefore, to confirm the results of our gene expression analysis, we used the cDNA sequences of the Chinese hamster, *C. griseus*, for a comparative analysis of the transcriptomic profiles in the IC from GASH:Sal and control Syrian hamsters, both of which were stimulated with sound. The Chinese hamster genome was recently published [43], and this species displays greater similarity to the Syrian hamster than to the mouse [44].

4.2. Early growth response genes

The *Egr1*, *Egr2*, and *Egr3* genes are immediate-early genes; this term refers to genes whose transcription can be rapidly and transiently induced by a broad range of cellular stimuli (environmental, physiological, and pathological stimuli) [45,46]. These genes encode the EGR family of zinc-finger proteins, which bind to DNA, RNA, or proteins [47,48].

The factors that induce the expression of these genes in mammalian cells include stress [49], which may be induced by chemical and physical external stressors [50] or internal stressors, such as cardiac stress [51], which elevates the *Egr* mRNA level. The increased transcription of *Egr* due to stress occurs in tissues as variant as the adrenal glands [52] and

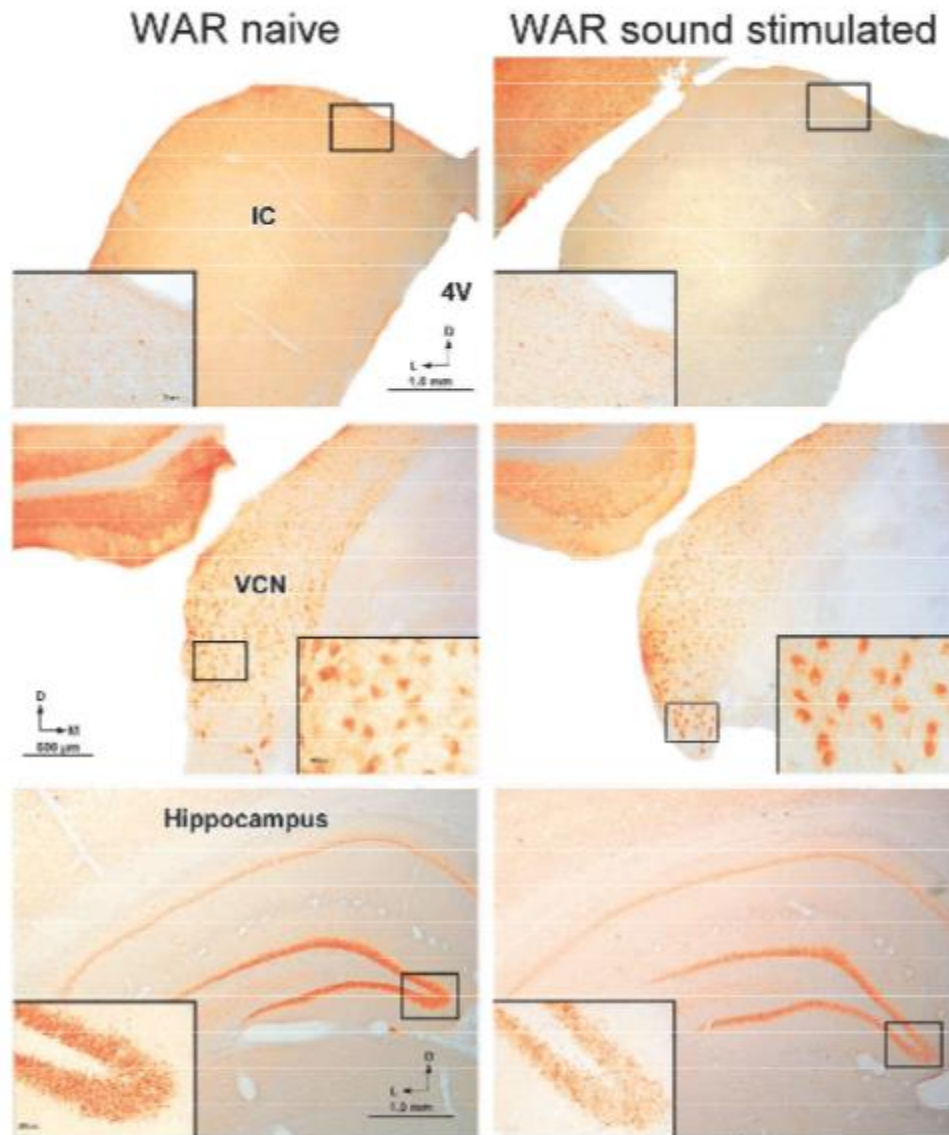


Fig. 4. Coronal sections of WAR were immunostained to visualize Egr3 protein expression. The inset shows a magnification of the boxed area. Abbreviations: 4v, fourth ventricle; IC, inferior colliculus; VCN, ventral cochlear nucleus.

the hippocampus [53]. It has been reported that Egr1 has a clear role in mediating gene expression required for some learning and memory processes [54,55], and Egr3 is associated with neuronal plasticity in response to stress and novelty [56]. In fact, the proteins expressed by the activity-regulated cytoskeletal-related (Arc) gene are directly regulated by Egr1 and Egr3, which can indirectly modulate synaptic plasticity by directly regulating Arc [57].

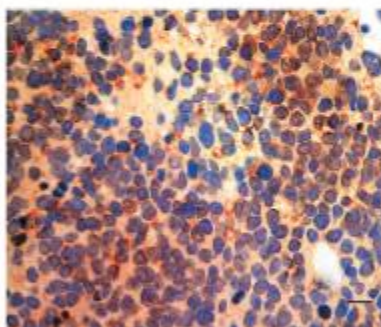


Fig. 5. Egr3 immunopositivity in lymphoid cells of GASH:Sal lymphoma tissue. Scale bar, 10 μm.

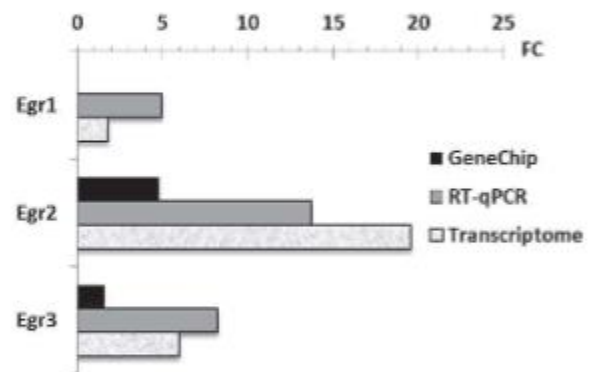


Fig. 6. Confirmation of the results for selected genes at the gene expression level. The fold changes in the expression levels of the three Egr transcripts in the IC of the sound-stimulated GASH:Sal compared to the sound-stimulated Syrian hamster controls were obtained by microarray, RT-qPCR, and transcriptomic analyses. Abbreviations: FC, fold change (relative mRNA levels).

tumor suppressor functions of *Egr1* and, consequently, its downregulation in breast, lung, and glial cancers [76–78]. In the near future, we plan to perform further research to determine whether *Egr3* can serve as a predictive marker of lymphoma and other cancer types.

5. Conclusions

Ictal events in strains susceptible to audiogenic seizures, specifically WAR and GASH:Sal, cause gene deregulation in the IC.

The technical limitations of the microarray analyses require the validation of the microarray data with real-time RT-PCR. The WAR and GASH:Sal exhibited overexpression of the early growth response genes *Egr1*, *Egr2*, and *Egr3*, presumably as an effect of the stress associated with seizures. The overexpression of these genes was higher in the WAR model than in the GASH:Sal model. These genes are transcription factors, and their activation precedes further transcriptional responses related to myelination processes, cell growth, apoptosis, LTD, and activation of transcriptional regulatory genes. Fig. 7 and Supplemental File 2 summarize the relationship between the *Egr* genes that were upregulated after an ictal event in the two models of audiogenic epilepsy studied, as well as their interconnection with other genes and cellular processes.

The present study showed for the first time upregulation of the early growth response genes *Egr1*, *Egr2*, and *Egr3* in the inferior colliculus (an epileptogenic focus) of the WAR and GASH:Sal strains.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.12.020>.

Acknowledgments

This study was supported by the Spanish JCyL (#SA023A12-2), University of Salamanca Research Support Grant 2015 (#P1) (to Dr. Dolores E. López), USP/USAL Program for the Promotion of the Bilateral Cooperation in the Field of Research (#2011.1.23386.1.3), USP/USAL (2011.1.23386.81.3), and FAPESP (07/50261-4) (to Norberto Garcia-Cairasco). Norberto Garcia-Cairasco holds a CNPq research fellowship.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- García-Cairasco N. Puzzling challenges in contemporary neuroscience: insights from complexity and emergence in epileptogenic circuits. *Epilepsy Behav* 2009;14(Suppl. 1):54–63.
- García-Cairasco N. Learning about brain physiology and complexity from the study of the epilepsies. *Braz J Med Biol Res* 2009;42:76–86.
- Tejada J, Costa KM, Bertti P, García-Cairasco N. The epilepsies: complex challenges needing complex solutions. *Epilepsy Behav* 2013;26:212–28.
- Fisher I, Chaban G, Hertz E. Abnormal metabolic response to excess potassium in astrocytes from the jimpy mouse, a convulsing neurological mutant. *Brain Res* 1980;181:482–7.
- Fisher RS. Animal models of the epilepsies. *Brain Res Rev* 1989;14:245–78.
- Case M, Soltesz I. Computational modeling of epilepsy. *Epilepsia* 2011;52:12–5.
- Engel J. Concepts of epilepsy. *Epilepsia* 1995;36(Suppl. 1):S23–9.
- Kandratavicius L, Balista PA, Lopes-Aguiar C, Ruggiero RN, Umeoka EH, Garcia-Cairasco N, et al. Animal models of epilepsy: use and limitations. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2014;10:1693–705.
- Serikawa T, Mashimo T, Kuramoto T, Voigt B, Ohno Y, Sasa M. Advances on genetic rat models of epilepsy. *Exp Anim* 2015;64(1):1–17.
- García-Cairasco N, Wakamatsu H, Oliveira JAC, Gomes ELT, Del Bel EA, Mello LEAM. Neuroethological and morphological (Neo-Timm staining) correlates of limbic recruitment during the development of audiogenic kindling in seizure susceptible Wistar rats. *Epilepsy Res* 1996;26:177–92.
- Doretto MC, Fonseca CG, Lobo RB, Terra VC, Oliveira JA, Garcia-Cairasco N. Quantitative study of the response to genetic selection of the Wistar audiogenic rat strain (WAR). *Behav Genet* 2003;33(1):33–42.
- Carballosa-Gonzalez MM, 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.
- Muñoz LJ, Carballosa-Gautam MM, Yanowsky K, García-Atarés N, López DE. The GASH:Sal. Where do we stand and where we're going. *Epilepsy Behav* 2016 [in press].
- Willott JF, Lu SM. Midbrain pathways of audiogenic seizures in DBA/2 mice. *Exp Neurol* 1980;70(2):288–99.
- Ross KC, Coleman JR. Developmental and genetic audiogenic seizure models: behavior and biological substrates. *Neurosci Biobehav Rev* 2000;24(6):639–53.
- Faingold CL. Emergent properties of CNS neuronal networks as targets for pharmacology: application to anticonvulsant drug action. *Prog Neurobiol* 2004;72(1):55–85.
- García-Cairasco N, Terra VC, Doretto MC. Midbrain substrates of audiogenic seizures in rats. *Behav Brain Res* 1993;58(1–2):57–67.
- García-Cairasco N, Sabbatini RM. Possible interaction between the inferior colliculus and the substantia nigra in audiogenic seizures in Wistar rats. *Physiol Behav* 1991;50(2):421–7.
- Kesner RP. Subcortical mechanisms of audiogenic seizures. *Exp Neurol* 1966;15(2):192–205.
- Wada JA, Terao A, White B, Jung E. Inferior colliculus lesion and audiogenic seizure susceptibility. *Exp Neurol* 1970;28(2):326–32.
- Ross KC, Coleman JR. Audiogenic seizures in the developmentally primed Long-Evans rat. *Dev Psychobiol* 1999;34(4):303–13.
- Barrera-Bailón B, Oliveira JAC, López DE, Muñoz LJ, García-Cairasco N, Sancho C. Pharmacological and neuroethological study of three antiepileptic drugs in the genetic audiogenic seizure hamster (GASH:Sal). *Epilepsy Behav* 2013;28(3):413–25.
- Fuentes-Santamaría V, Cantos R, Alvarado JC, García-Atarés N, López DE. Morphological and neurochemical abnormalities in the auditory brainstem of the genetically epilepsy-prone hamster (GPG/Vall). *Epilepsia* 2005;46(7):1027–46.
- Gómez-Nieto R, Rubio ME, López DE. Cholinergic input from the ventral nucleus of the trapezoid body to cochlear nucleus of the trapezoid to cochlear root neurons in rats. *J Comp Neurol* 2008;506:452–68.
- Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, et al. Exploration, normalization, and summarization of high density oligonucleotide array probe level data. *Bioinformatics* 2003;19(2):149–64.
- Li C, Wong WH. Model-based analysis of oligonucleotide arrays: expression index computation and outlier detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(1):31–6.
- Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* 2003;19(2):185–93.
- Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res* 2003;31(4):e15.
- Barash Y, Dehan E, Krupsky M, Franklin W, Geraci M, Friedman N, et al. Comparative analysis of algorithms for signal quantification from oligonucleotide microarrays. *Bioinformatics* 2004;20(6):839–46.
- Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(9):5116–21.
- Benjamini Y, Drai D, Elmer G, Kafkafi N, Golani I. Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav Brain Res* 2001;125(1–2):279–84.
- Storey JD, Tibshirani R. Statistical significance for genome wide studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(16):9440–5.
- Edgar R, Domrachev M, Lash AE. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res* 2002;30:207–10.
- Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 2009;4(1):44–57.
- Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 2004;64(15):5245–50.
- Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008;3(6):1101–8.
- Burns MJ, Nixon GJ, Foy CA, Harris N. Standardisation of data from real-time quantitative PCR methods – evaluation of outliers and comparison of calibration curves. *BMC Biotechnol* 2005;5:31.
- Li S, Miao T, Sebastian M, Bhullar P, Ghaffari E, Liu M, et al. The transcription factors *Egr2* and *Egr3* are essential for the control of inflammation and antigen-induced proliferation of B and T cells. *Immunity* 2012;37(4):685–96.
- Muñoz LJ, Ludeña D, Gedvilaite A, Zvirbliene A, Jandrig B, Voronkova T, et al. Lymphoma outbreak in the hamster GASH:Sal strain. *Arch Virol* 2013;150:2255–65.
- Morey JS, Ryan JC, Van Dolah FM. Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biol Proced Online* 2006;8:175–93.
- Honkanieni J, Sharp FR. Prolonged expression of zinc finger immediate-early gene mRNAs and decreased protein synthesis following kainic acid induced seizures. *J Neurosci* 1999;19(1):10–7.
- Fabre PH, Hautier L, Dimitar Dimitrov D, Douzery EJP. A glimpse on the pattern of rodent diversification: a phylogenetic approach. *BMC Evol Biol* 2012;12:88.
- Lewis NE, Liu X, Li Y, Nagarajan H, Yerganian G, O'Brien E, et al. Genomic landscapes of Chinese hamster ovary cell lines as revealed by the *Cricetulus griseus* draft genome. *Nat Biotechnol* 2013;31(8):759–65.
- Tchitchek N, Safranetz D, Rasmussen AL, Martens C, Virtaneva K, Porcella SF, et al. Sequencing, annotation and analysis of the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) transcriptome. *PLoS One* 2014;9(11):e112617.
- Beckmann MA, Wilce PA. *Egr* transcription factors in the nervous system. *Neurochem Int* 1997;31:477–510.
- Patwardhan S, Gashler A, Siegel MG, Chang LC, Joseph LJ, Shows TB, et al. *EGR3*, a novel member of the *Egr* family of genes encoding immediate-early transcription factors. *Oncogene* 1991;6:917–28.

- [47] Crosby SD, Puetz JJ, Simburger KS, Fahrner TJ, Milbrandt J. The early response gene NGFI-C encodes a zinc finger transcriptional activator and is a member of the GCGGGGGCG (GSG) element-binding protein family. *Mol Cell Biol* 1991;11:3835–41.
- [48] O'Donovan KJ, Tourtellotte WG, Milbrandt J, Baraban JM. The EGR family of transcription-regulatory factors: progress at the interface of molecular and systems neuroscience. *Trends Neurosci* 1999;22:167–73.
- [49] Senba E, Ueyama T. Stress-induced expression of immediate early genes in the brain and peripheral organs of the rat. *Neurosci Res* 1997;29(3):183–207.
- [50] Ronkina N, Menon MB, Schwermann J, Arthur JSC, Legault H, Telliez J-B, et al. Stress induced gene expression: a direct role for MAPKAP kinases in transcriptional activation of immediate early genes. *Nucleic Acids Res* 2011;39(7):2503–18.
- [51] Shieh JTC, Huang Y, Gilmore J, Srivastava D. Elevated miR-499 levels blunt the cardiac stress response. *PLoS One* 2011;6(5):e19481.
- [52] Honkaniemi J, Zhang JS, Longo FM, Sharp FR. Stress induces zinc finger immediate early genes in the rat adrenal gland. *Brain Res* 2000;877(2):203–8.
- [53] Honkaniemi J, States BA, Weinstein PR, Espinoza J, Sharp FR. Global ischemia induces immediate early genes encoding zinc finger transcription factors. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997;17:636–46.
- [54] Abraham WC, Dragunow M, Tate WP. The role of immediate early genes in the stabilization of long-term potentiation. *Mol Neurobiol* 1991;5:297–314.
- [55] Worley PF, Bhat RV, Baraban JM, Erickson CA, McNaughton BL, Barnes CA. Thresholds for synaptic activation of transcription factors in hippocampus: correlation with long-term enhancement. *J Neurosci* 1993;13:4776–86.
- [56] Gallitano-Mendel A, Izumi Y, Tokuda K, Zorumski CF, Howell MP, Muglia LJ, et al. The immediate early gene early growth response gene 3 mediates adaptation to stress and novelty. *Neuroscience* 2007;148:633–43.
- [57] Li L, Carter J, Gao X, Whitehead J, Tourtellotte WG. The neuroplasticity-associated arc gene is a direct transcriptional target of early growth response (Egr) transcription factors. *Mol Cell Biol* 2005;25(23):10286–300.
- [58] Poirier R, Cheval H, Mailhes C, Garel S, Charnay P, Davis S, et al. Distinct functions of Egr gene family members in cognitive processes. *Front Neurosci* 2008;2(1):47–55.
- [59] Lindecke A, Korte M, Zagrebelsky M, Horejschi V, Elvers M, Widera D, et al. Long-term depression activates transcription of immediate early transcription factor genes: involvement of serum response factor. *Eur J Neurosci* 2006;24:555–63.
- [60] Beckmann AM, Matsumoto I, Wilce PA. AP-1 and Egr DNA-binding activities are increased in rat brain during ethanol withdrawal. *J Neurochem* 1997;69(1):306–14.
- [61] Honkaniemi J, Sharp FR. Prolonged expression of zinc finger immediate-early gene mRNAs and decreased protein synthesis following kainic acid induced seizures. *Eur J Neurosci* 1999;11(1):10–7.
- [62] Roberts DS, Hu Y, Lund IV, Brooks-Kayal AR, Russek SJ. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-induced synthesis of early growth response factor 3 (Egr3) controls the levels of type A GABA receptor α 4 subunits in hippocampal neurons. *J Biol Chem* 2006;281(40):29431–5.
- [63] Fumoto N, Mashimo T, Masui A, Ishida S, Mizuguchi Y, Minamimoto S, et al. Evaluation of seizure foci and genes in the Lgi1(L385R/+) mutant rat. *Neurosci Res* 2014;80:69–75.
- [64] Rakhade SN, Yao B, Ahmed S, Asano E, Beaumont TL, Shah AK, et al. A common pattern of persistent gene activation in human neocortical epileptic foci. *Ann Neurol* 2005;58:736–47.
- [65] Fernandes OM, Tourtellotte WG. Egr3-dependent muscle spindle stretch receptor intrafusal muscle fiber differentiation and fusimotor innervation homeostasis. *J Neurosci* 2015;35(14):5566–78.
- [66] Chandra R, Francis TC, Konkalmatt P, Amgalan A, Gancarz AM, Dietz DM, et al. Opposing role for Egr3 in nucleus accumbens cell subtypes in cocaine action. *J Neurosci* 2015;35(20):7927–37.
- [67] Grabenstatter HL, Russek SJ, Brooks-Kayal AR. Molecular pathways controlling inhibitory receptor expression. *Epilepsia* 2012;53(Suppl. 9):71–8.
- [68] Roberts DS, Raol YH, Bandyopadhyay S, Lund IV, Budreck EC, Passini MJ, et al. Egr3 stimulation of GABRA4 promoter activity as a mechanism for seizure-induced up-regulation of GABAA receptor α 4 subunit expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(33):11894–9.
- [69] Prieto-Martín AI, Aroca-Aguilar JD, Sánchez-Sánchez F, Muñoz LJ, López DE, Escibano J, et al. Molecular and neurochemical substrates of the audiogenic seizure strains: the GASH:Sal model. *Epilepsy Behav* 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.05.025>.
- [70] Quach DH, Oliveira-Fernandes M, Gruner KA, Tourtellotte WG. A sympathetic neuron autonomous role for Egr3-mediated gene regulation in dendrite morphogenesis and target tissue innervation. *J Neurosci* 2013;33(10):4570–83.
- [71] Tourtellotte WG, Milbrandt J. Sensory ataxia and muscle spindle agenesis in mice lacking the transcription factor Egr3. *Nat Genet* 1998;20:87–91.
- [72] Sumitomo S, Fujio K, Okamura T, Yamamoto K. Egr2 and Egr3 are the unique regulators for systemic autoimmunity. *JAKSTAT* 2013;2(2), e23952.
- [73] Lazarevic V, Zullo AJ, Schweitzer MN, Staton TL, Gallo EM, Crabtree GR, et al. The gene encoding early growth response 2, a target of the transcription factor NFAT, is required for the development and maturation of natural killer T cells. *Nat Immunol* 2009;10:306–13.
- [74] Pio R, Jia Z, Baron VT, Mercola D. Early growth response 3 (Egr3) is highly overexpressed in non-relapsing prostate cancer but not in relapsing prostate cancer. *PLoS One* 2013;8(1):e54096.
- [75] Inoue A, Omoto Y, Yamaguchi Y, Kiyama R, Hayashi SL. Transcription factor EGR3 is involved in the estrogen-signaling pathway in breast cancer cells. *J Mol Endocrinol* 2004;32:649–61.
- [76] Levin WJ, Casey G, Ramos JC, Arboleda MJ, Reissmann PT, Slamon DJ. Tumor suppressor and immediate early transcription factor genes in non-small cell lung cancer. *Chest* 1994;106:372S–6S.
- [77] Huang RP, Liu C, Fan Y, Mercola D, Adamson ED. Egr-1 negatively regulates human tumor cell growth via the DNA-binding domain. *Cancer Res* 1995;55:5054–62.
- [78] Calogero A, Arcella A, De Gregorio G, Porcellini A, Mercola D, Liu C, et al. The early growth response gene EGR-1 behaves as a suppressor gene that is down-regulated independent of ARF/Mdm2 but not p53 alterations in fresh human gliomas. *Clin Cancer Res* 2001;7:2788–96.

Anexo 6. *Overexpression of the immediate-early genes Egr1, Egr2, and Egr3 in two strains of rodents susceptible to audiogenic seizures.*