

Biomarcadores asociados con scrapie y otras encefalopatías espongiiformes transmisibles

H. Filali*, I. Martín-Burriel**, J.J. Badiola* y R. Bolea*,¹

* Centro de Investigación en Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes. Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza. Zaragoza, España

** Laboratorio de Genética Bioquímica (LAGENBIO), Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España

Resumen

Las encefalopatías espongiiformes transmisibles (EETs), o enfermedades priónicas, son enfermedades neurodegenerativas que afectan tanto a los animales como al hombre, siendo el scrapie el modelo prototipo de este grupo de enfermedades. Los mecanismos específicos de la patogenia asociada a las EETs no se conocen en profundidad. Las herramientas genómicas podrían ayudar a la aclaración de algunos de los mecanismos moleculares de la patología de estas enfermedades, comparando el nivel transcripcional entre individuos sanos y enfermos. Asimismo, podrían permitir la identificación de moléculas útiles para el diagnóstico y dianas terapéuticas en las EETs y otras enfermedades neurodegenerativas. Hasta el momento, los trabajos realizados han detectado multitud de potenciales biomarcadores a nivel génico. Estos genes codifican proteínas implicadas en el metabolismo lipídico, proteasas, inhibidores de proteasa y chaperonas. Sin embargo, los genes que han llegado a confirmarse como biomarcadores específicos para las EETs son muy pocos. Otras aproximaciones moleculares, como la proteómica, la secuenciación masiva o la PCR cuantitativa, se han utilizado con los mismos fines. En este trabajo se revisan los resultados obtenidos hasta el momento. La búsqueda de nuevos biomarcadores asociados a las EETs sigue siendo necesaria, principalmente en los hospedadores naturales de la enfermedad. Hasta el momento, la mayoría de los estudios se han realizado en ratones como modelos de EETs, pero el conocimiento del genoma de hospedadores naturales como el ovino permite aplicar la genómica en estas especies.

Palabras clave: Prión, modelos, genómica, proteómica.

Abstract

Biomarkers associated with scrapie and other transmissible spongiform encephalopathies

Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs), or prion diseases, are neurodegenerative diseases that affect animals and humans, being scrapie the prototype disorder for this group of diseases. The specific mechanisms of pathogenesis associated with TSEs are not well understood. Genomic tools could assist in clarifying some of the molecular mechanisms of the associated pathology, comparing the transcriptional level between healthy and infected individuals. Moreover, it could allow the identification of molecules for diagnostic and for therapeutic targets in TSEs and other neurodegenerative diseases. So far, the studies developed have identified many potential biomarkers at the genetic level. These genes encode proteins involved in lipid metabolism, proteases, protease inhibitors and chaperones. However, the genes confirmed as specific biomarkers for TSEs are very few. Other molecular approaches, as proteomics,

1. Autor para correspondencia: rbolea@unizar.es
<http://dx.doi.org/10.12706/itea.2014.004>

next generation sequencing or quantitative PCR, are used for the same purposes. In this study the results obtained so far are reviewed. The identification of new biomarkers associated with TSEs is still necessary, especially in the natural hosts of these diseases. Most studies have been conducted in mice as animal models of TSEs, but the knowledge of the genomes of natural hosts, such as ovine, makes possible the use of genomic tools in these species.

Key words: Prion, models, genomic, proteomic.

Introducción

El scrapie es una enfermedad neurodegenerativa que afecta de forma natural a ovejas y cabras. El scrapie ovino es la enfermedad prototipo de las encefalopatías espongiformes transmisibles (EETs) y fue la primera en identificarse. Esta patología fue descrita por primera vez en el año 1732 en la raza ovina merina (McGowan, 1922) y posteriormente se ha descrito prácticamente en todo el mundo, siendo una enfermedad endémica en muchos países durante décadas. Las EETs, o enfermedades priónicas, se caracterizan por la acumulación en el sistema nervioso central (SNC) de la proteína PrP^{Sc}, una isoforma anormal de una glicoproteína de membrana fisiológica denominada PrP celular (PrP^C) (Prusiner *et al.*, 1982). A pesar de que el scrapie ovino se conoce desde el siglo XVIII, numerosos aspectos relacionados con la patogenia y transmisión de esta enfermedad todavía se desconocen. Además, aunque la presencia de la PrP^C en las células es necesaria para el desarrollo de las EETs y su nivel de expresión está relacionado con el periodo de incubación y la progresión de la enfermedad, la función exacta de esta proteína todavía no se ha esclarecido (Nicolas *et al.*, 2009; Bremer *et al.*, 2010; Coleman *et al.*, 2012). La PrP^{Sc} se acumula principalmente en las células del SNC, y en menor medida en otras células de tejidos periféricos como las del sistema linforeticular (SLR) (Andreoletti *et al.*, 2000). Hasta hoy, la proteína anormal PrP^{Sc} es el único componente conocido del agente causal de las EETs y su presencia en los tejidos de los individuos afectados por las EETs se uti-

liza como el único marcador de la presencia y distribución de la infectividad (Aguzzi y Falsig, 2012).

El impacto de las EETs animales es doble, en primer lugar por el carácter zoonótico de alguna de ellas y en segundo por el impacto económico sobre la producción animal. A pesar de que el scrapie es endémico desde hace muchas décadas en distintos países, nunca se ha descrito su transmisión a humanos. Sin embargo, la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) se ha asociado con la variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vECJ) en la especie humana. A partir del descubrimiento de la vECJ se incrementó la preocupación mundial acerca de la seguridad alimentaria y la salud pública. Además, las EETs animales han causado enormes pérdidas económicas. Desde el principio de la epidemia de la EEB (1986), se han sacrificado millones de animales de las especies bovina y ovina y el embargo de la importación de carne procedente de los países afectados ha costado miles de millones de euros.

Desde el comienzo de la crisis alimentaria provocada por la EEB se han realizado notables esfuerzos para desarrollar métodos sensibles de detección de los agentes causantes de la enfermedad, para así controlar la propagación de las EETs humanas y animales. La mayoría de las pruebas de diagnóstico de las EETs disponibles se basan en la detección directa de la forma resistente a la digestión con proteinasa K (PK) de la proteína prión (PrP^{Sc}) en el SNC y en el SLR. Aunque las metodologías para el diagnóstico postmortem del

prión se consideran sensibles y específicas, el uso de la PrP^{Sc} como biomarcador eficaz de diagnóstico antemortem en la fase preclínica de la enfermedad se considera imposible, debido a que la presencia de la PrP^{Sc} es mínima en tejidos accesibles o fluidos corporales (sangre, orina, saliva y líquido cefalorraquídeo (LCR) (Gough y Maddison, 2010). Además, recientemente se han descubierto nuevas isoformas patológicas de PrP que son sensibles a PK, y que pueden ejercer un papel importante en la patogénesis de algunas enfermedades priónicas y no son detectables por los métodos diagnósticos actuales (Gambetti et al., 2008). Por lo tanto, las pruebas convencionales pueden mostrar una discordancia significativa entre las cantidades detectables y reales de la proteína prión que genera la infección (Andreoletti et al., 2012). En consecuencia, se requiere el desarrollo de nuevas pruebas de diagnóstico que no se basen exclusivamente en la determinación de PrP^{Sc} y la digestión con PK. Además, dada la situación actual de las enfermedades priónicas, un test para diagnosticar la ECJ en su fase inicial aumentaría considerablemente las posibles estrategias de tratamiento de la enfermedad. Otro reto para el diagnóstico y la vigilancia de estas enfermedades es el control de las transfusiones de sangre (Andreoletti et al., 2012) durante el largo periodo de incubación de las enfermedades priónicas, que puede durar meses o años (hasta 40 años).

Según Huzarewich et al. (2010), un biomarcador se define como una sustancia discriminante que puede ser medida objetivamente y que se utiliza como un indicador de procesos biológicos o patogénicos, o bien de respuesta farmacológica a un tratamiento terapéutico. Pueden considerarse biomarcadores desde parámetros físicos (temperatura o presión arterial), imágenes de lesiones patológicas hasta la presencia de moléculas biológicas en tejidos y fluidos corporales. Desde hace ya tiempo se ha perseguido la identificación de biomarcadores distintos a la PrP^{Sc}

como herramientas para el diagnóstico de enfermedades priónicas. La mayoría de los biomarcadores descritos hasta el momento, se detectan en un estado avanzado de la enfermedad. Un biomarcador ideal sería aquel capaz de diagnosticar todos los tipos de EETs, así como los individuos que se encuentren en estados preclínicos de la infección.

Las tecnologías "ómicas" (genómica y proteómica) constituyen unas herramientas muy útiles para identificar potenciales biomarcadores para diagnóstico, así como aquellos que permitan seguir la progresión de la enfermedad, y otros para determinar los potenciales riesgos de su transmisión (Huzarewich et al., 2010). Estas tecnologías se están haciendo cada vez más accesibles a los laboratorios de investigación y diagnóstico. El uso de microarrays (Ness, 2007) o la secuenciación masiva del transcriptoma (Mortazavi et al., 2008; Rosenkranz et al., 2008; Wilhelm et al., 2008) permiten comparar los niveles de expresión génica global entre muestras de individuos enfermos y sanos, o entre diversos estadios de la enfermedad, para así poder determinar genes implicados en estas patologías y posibles biomarcadores. Por su parte, las técnicas de captura por láser, marcaje fluorescente de saturación y espectrometría de masas están siendo utilizadas para la detección de biomarcadores proteicos (Wilson et al., 2005).

Además de la búsqueda de biomarcadores indicativos de la presencia de enfermedad, del estado de la misma o de su respuesta a tratamientos, se han realizado importantes esfuerzos para determinar marcadores que expliquen las diferencias entre individuos en cuanto a la susceptibilidad a estas enfermedades. Se conoce que ciertos polimorfismos del gen de la proteína prión (PRNP) influyen en la susceptibilidad a estas enfermedades en las especies humana (Aguzzi, 2006) y ovina (Hunter, 2007). Sin embargo, las variaciones en este gen sólo explican parte de la variación genética existente en las EETs (Diaz et al., 2005). Se han realizado análisis genómicos en busca

de otras variantes génicas que puedan explicar parte de esta diferencia individual en cuanto a susceptibilidad o periodo de incubación de estas enfermedades, descubriéndose QTLs (Quantitative Trait loci) o genes candidatos (Stephenson *et al.*, 2000; Moreno *et al.*, 2003; Mead *et al.*, 2009). Estos estudios de genómica estructural se han basado fundamentalmente en el análisis de polimorfismos del DNA distribuidos a lo largo del genoma, marcadores microsatélites o SNPs (polimorfismo de nucleótido simple); y en el estudio de ligamiento o asociación (GWAS: Genome wide association studies) de estos polimorfismos con la susceptibilidad o el periodo de incubación de estas patologías.

Finalmente, la combinación de los estudios de genómica estructural y funcional están permitiendo la identificación de eQTL (expresión quantitative trait loci) o loci que regulan los niveles de expresión génica. Como la abundancia de un transcrito puede estar modificada por polimorfismos en los elementos reguladores del gen que se expresa (Nicolae *et al.*, 2010), la combinación de los microarrays de polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) con microarrays de expresión permite la identificación de eQTL o mutaciones que están regulando, especialmente en *cis*, la expresión de genes localizados en regiones QTL asociadas a la susceptibilidad de la enfermedad en estudio (Cookson *et al.*, 2009; Gamazon *et al.*, 2010; Nicolae *et al.*, 2010).

Según las fuentes consultadas, todavía no existen trabajos de este tipo en el campo de las enfermedades priónicas, aunque se han determinado eQTLs en otras enfermedades neurodegenerativas como la forma esporádica de ELA (Esclerosis Lateral Amiotrófica) (Diekstra *et al.*, 2012). Aunque no a nivel genómico, si que se han estudiado polimorfismos en genes candidatos que podrían regular el periodo de incubación o la susceptibilidad de estas patologías (Grizenkova *et al.*, 2010; Lloyd *et al.*, 2010).

Biomarcadores para las EETs y otras enfermedades neurodegenerativas

Se han realizado pocos estudios sobre los cambios de los perfiles de expresión génica en tejidos procedentes de individuos afectados de forma natural por EETs, como el scrapie ovino (Cosseddu *et al.*, 2007; Filali *et al.*, 2011; Filali *et al.*, 2012), la EEB (Khaniya *et al.*, 2009), la EDC (Basu *et al.*, 2012) o la ECJ humana (Xiang *et al.*, 2005). Las prionopatías naturales han sido poco estudiadas debido a la rareza de los casos humanos, los problemas de heterogeneidad de muestras generadas en ámbitos naturales de las distintas enfermedades y la facilidad que supone el trabajo en roedores en comparación con los grandes animales. En los estudios genómicos realizados en la enfermedad natural se han observado cambios transcripcionales que señalan alteraciones en vías de la función neuronal, incluyendo el ciclo celular, la muerte celular y la respuesta al estrés.

Por el contrario, se han realizado una importante cantidad de análisis genómicos, principalmente en tejido nervioso, en modelos murinos adaptados a las enfermedades priónicas, incluyendo la ECJ, el scrapie y la EEB (Dandoy-Dron *et al.*, 1998; Booth *et al.*, 2004b; Brown *et al.*, 2004; Riemer *et al.*, 2004; Xiang *et al.*, 2004; Skinner *et al.*, 2006; Sorensen *et al.*, 2008; Guillaume-Bosselut *et al.*, 2009; Tortosa *et al.*, 2011). Estos estudios han revelado alteraciones generalizadas de múltiples vías celulares que se correlacionan con la aparición de la patología asociada a la enfermedad. Estos cambios incluyen, entre otras, modificaciones de genes implicados en la homeostasis del colesterol, la regulación de la apoptosis, la respuesta al estrés y la homeostasis de iones metálicos. El patrón más consistente observado en estos modelos experimentales es la aparición de cambios moleculares relacionados con neuroinflamación. Este proceso estaría inducido probablemente por el daño ce-

lular y la muerte neuronal. Muchos de estos cambios transcripcionales han sido identificados en otras enfermedades neurodegenerativas (Tabla 1). Aunque la expresión diferencial de estos genes no es específica para las EETs, el uso de estos genes implicados en la neuroinflamación como biomarcadores puede ser una excelente elección tanto para el seguimiento del estado neurodegenerativo, como para predecir la respuesta al tratamiento.

Los estudios destinados a la identificación de marcadores génicos que permitan explicar las diferencias individuales en cuanto a susceptibilidad o periodo de incubación de estas enfermedades se han realizado tanto en modelos murinos de EETs (Moreno et al., 2003) como en las especies que padecen estas patologías de forma natural, la especie humana (Mead et al., 2009), ovina (Moreno et al., 2010), bovina (Murdoch et al., 2011) o cérvidos (Matsumoto et al., 2013). Estos estudios han determinado genes candidatos implicados en procesos que podrían desempeñar un papel importante en la patología y la patogenia de estas enfermedades. Entre estos genes candidatos encontraríamos el gen del receptor del ácido retinoico (*RARB*), el de un regulador de la estabilidad de los microtúbulos en células neuronales (*STMN2*), genes involucrados en el tráfico de membrana (*Cpne8*) (Mead et al., 2009), codificantes de proteínas con actividad chaperona (*HSP90AA1*) (Marcos-Carcavilla et al., 2010), o receptores que pudieran explicar la barrera entre especies observada en estas patologías como el del receptor de la laminina (*RPSA*) (Marcos-Carcavilla et al., 2008b).

Biomarcadores genómicos en tejido nervioso

Los estudios del transcriptoma en muestras del SNC evidencian problemas de heterogeneidad de datos entre los resultados obtenidos en regiones específicas como médula oblongada, corteza cerebral o puente, y los detectados uti-

lizando homogenizado de todo el encéfalo, donde los cambios específicos del área quedarían diluidos en el conjunto global. Estas diferencias entre áreas son manifiestas tanto a nivel genómico (Riemer et al., 2004), como cuando se analizan rutas moleculares específicas, por ejemplo en la activación de la apoptosis (Serrano et al., 2009; Hedman et al., 2012) o en la activación de chaperonas (Serrano et al., 2011). Este hecho podría ser consecuencia de que el cerebro está compuesto de distintos tipos de células, y es posible que cada tipo reaccione de forma variable a la infección por priones. Asimismo, se debe tener en cuenta el distinto grado lesional que presentan estas áreas en los individuos afectados.

Algunos de los genes identificados en los estudios de expresión genómica pueden servir como marcadores para el diagnóstico de la enfermedad, o ser candidatos para su uso en estrategias terapéuticas. Hasta el momento se han identificado un gran número de genes potencialmente útiles como biomarcadores (véase Tablas 1 y 2) que han contribuido al conocimiento de las vías moleculares que intervienen en la patogenia de estas enfermedades. Sin embargo, muy pocos genes diferencialmente transcritos se han confirmado como biomarcadores útiles para el diagnóstico de las EETs. Entre ellos podemos resaltar el de la α_1 -antiquimotripsina (α_1 -ACT) (Miele et al., 2008) y la cistatina C (*CST3*) (Sanchez et al., 2004). El primero de ellos fue identificado mediante estudios del transcriptoma de cerebros de ratones infectados con scrapie y posteriormente, tal y como se describe en el apartado "Biomarcadores proteómicos", se ha consolidado como biomarcador para estas patologías. La cistatina C se identificó casi de forma simultánea mediante técnicas proteómicas (Sanchez et al., 2004) y genómicas (Brown et al., 2004). Estos biomarcadores se pueden detectar en LCR por lo que pueden ser utilizados para el diagnóstico de estas patologías en pacientes. Estos ejemplos son es-

Tabla 1. Genes con expresión diferencial en EETs y otras enfermedades neurodegenerativas (Huzarewich et al., 2010)
 Table 1. Genes differentially expressed in TSEs and other neurodegenerative diseases

Gen	Descripción	EETs	Otras enfermedades neurodegenerativas*
ABCA1	ATP unión de casete A1	Scrapie (Riemer et al., 2004; Xiang et al., 2004; Sorensen et al., 2008)	EA
APLP1	Similar al precursor de la proteína Beta amiloide 1	Scrapie (Sorensen et al., 2008)	EA
APOD	Apolipoproteína D	BSE y scrapie (Dandoy-Dron et al., 1998; Riemer et al., 2004; Skinner et al., 2006; Sorensen et al., 2008)	EA, NPC
APOE	Apolipoproteína E	Scrapie (Xiang et al., 2004; Skinner et al., 2006; Sorensen et al., 2008)	EA, EP y ETM
B2M	Microglobulina beta2	Scrapie (Xiang et al., 2004; Skinner et al., 2006; Sorensen et al., 2008)	EA, Tay-Sachs, Enfermedad de Sandhoff y ETM
CD9	CD9	Scrapie (Riemer et al., 2004; Xiang et al., 2004; Skinner et al., 2006; Sorensen et al., 2008)	SSPE y CMT
CLU	Clusterina	Scrapie (Brown et al., 2004; Skinner et al., 2006; Sorensen et al., 2008)	EA y EP
CST3	Cistatina C	Scrapie (Brown et al., 2004; Skinner et al., 2006; Sorensen et al., 2008)	EA y CMT
CTSB	Catepsina B	Scrapie (Xiang et al., 2004; Skinner et al., 2006; Sorensen et al., 2008)	EA, Tay-Sachs y Enfermedad de Sandhoff
CTSS	Catepsina S	BSE y scrapie (Dandoy-Dron et al., 1998; Riemer et al., 2004; Xiang et al., 2004; Skinner et al., 2006; Sorensen et al., 2008)	EA
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial	BSE y scrapie (Dandoy-Dron et al., 1998; Riemer et al., 2004; Xiang et al., 2004; Skinner et al., 2006; Sorensen et al., 2008)	Tay-Sachs, Enfermedad de Sandhoff, ETM y EA
SPARC	Proteína secretada, ácida, rica en cisteína (osteonectina)	Scrapie (Sorensen et al., 2008)	Tay-Sachs, Enfermedad de Sandhoff y ETM
SPP1	Fosfoproteína secretada 1 (osteopontina)	Scrapie (Xiang et al., 2004; Sorensen et al., 2008)	EP

* CMT: Síndrome de Charcot-Marie-Tooth, EA: Enfermedad de Alzheimer, EP: Enfermedad de Parkinson, ETM: Esclerosis temporal mesial y NPC: Enfermedad de Niemann-Pick tipo C.

Tabla 2. Listado de genes con expresión diferencial en tejido nervioso de individuos con EETs
 Table 2. List of genes with differential expression in nervous tissue of individuals with TSEs

Grupo de genes	Gen	Función	Citas
Genes implicados en el metabolismo lipídico	ABCA1	Vía de eliminación de lípidos	(Riemer et al., 2004; Sorensen et al., 2008)
	APOC1	Stranportador de lípidos secretados	(Baker y Manuelidis, 2003)
	APOD	Stranportador de lípidos secretados	(Dandoy-Dron et al., 1998; Booth et al., 2004b; Riemer et al., 2004; Sorensen et al., 2008)
	APOE	Stranportador de lípidos secretados	(Baker y Manuelidis, 2003; Booth et al., 2004b; Sorensen et al., 2008)
	CD36	Mediador de absorción y transporte de lípidos	(Baker y Manuelidis, 2003)
	CD68	Mediador de absorción y transporte de lípidos	(Baker y Manuelidis, 2003; Xiang et al., 2004)
	CYP51	Biosíntesis de esteroides	(Riemer et al., 2004)
	DBI	Transporte de Acil-CoA	(Booth et al., 2004b; Sorensen et al., 2008)
	ELOVL	Síntesis de ácidos grasos	(Riemer et al., 2004)
	FABP5	Proteína de unión con lípidos	(Baker y Manuelidis, 2003)
	FDFT1	Biosíntesis de colesterol	(Riemer et al., 2004)
	FDPS	Biosíntesis de isopreno	(Riemer et al., 2004)
	GRN	Fosfolipasa A2/citokinal/ unión con Ca	(Booth et al., 2004b; Sorensen et al., 2008)
	HMGCR	Biosíntesis de colesterol	(Riemer et al., 2004)
	HMGCS	Cetogénesis	(Riemer et al., 2004)
	IPP	Biosíntesis de colesterol	(Riemer et al., 2004)
	LDLR	Metabolismo de colesterol	(Riemer et al., 2004)
	LPL	Metabolismo de HDL	(Baker y Manuelidis, 2003; Riemer et al., 2004; Xiang et al., 2004)
	PLTP	Unión con lípidos/Transporte	(Booth et al., 2004b)
	SAA3	Componente mayor de HDL	(Baker y Manuelidis, 2003)
SC4MOL	Biosíntesis de esteroides	(Riemer et al., 2004)	
SC5DL	Biosíntesis de colesterol	(Riemer et al., 2004)	
SCAP	Activación del biosíntesis delipidos	(Booth et al., 2004b)	
SGPP1	Esfingalina-1-fosfato fosfatasa	(Booth et al., 2004b; Sorensen et al., 2008)	
SQLE	Biosíntesis de esteroides	(Riemer et al., 2004)	
SRD	Biosíntesis de esteroides	(Riemer et al., 2004)	
TSPO	Proteína de unión con lípidos	(Baker y Manuelidis, 2003)	
VLDLR	Receptor de VLDL	(Baker y Manuelidis, 2003)	

Tabla 2. Listado de genes con expresión diferencial en tejido nervioso de individuos con EETs (continuación)
 Table 2. List of genes with differential expression in nervous tissue of individuals with TSEs (continuation)

Grupo de genes	Gen	Función	Citas
Genes codificantes de proteasas e inhibidores de proteasa	<i>ADAM23</i>	Inhibidor de proteasa de cisteína	(Booth et al., 2004b)
	<i>CST3</i>	Inhibidor de proteasa de cisteína	(Booth et al., 2004b; Sorensen et al., 2008)
	<i>CST7</i>	Inhibidor de proteasa	(Baker y Manuelidis, 2003; Riemer et al., 2004; Xiang et al., 2004)
	<i>CTSB</i>	Endopeptidasa tipo cisteína	(Booth et al., 2004b; Sorensen et al., 2008)
	<i>CTSC</i>	Endopeptidasa tipo cisteína	(Riemer et al., 2004; Xiang et al., 2004)
	<i>CTSD</i>	Endopeptidasa tipo cisteína	(Riemer et al., 2004; Xiang et al., 2004; Tang et al., 2009)
	<i>CTSH</i>	Endopeptidasa tipo cisteína	(Baker y Manuelidis, 2003; Booth et al., 2004b; Riemer et al., 2004; Xiang et al., 2004; Sorensen et al., 2008)
	<i>CTSK</i>	Endopeptidasa tipo cisteína	(Booth et al., 2004b; Sorensen et al., 2008)
	<i>CTSL</i>	Endopeptidasa tipo serina	(Baker y Manuelidis, 2003)
	<i>CTSS</i>	Endopeptidasa tipo cisteína	(Dandoy-Dron et al., 1998; Baker y Manuelidis, 2003; Booth et al., 2004b; Riemer et al., 2004; Xiang et al., 2004; Sorensen et al., 2008; Tang et al., 2009)
	<i>CTSZ</i>	Endopeptidasa tipo cisteína	(Riemer et al., 2004; Xiang et al., 2004; Tang et al., 2009)
	<i>FURIN</i>	Furina O-sialoglicoproteína endopeptidasa	(Booth et al., 2004b)
	<i>HEXA</i>	Hidrolasa lisosomal	(Kopacek et al., 2000)
	<i>HEXB</i>	Hidrolasa lisosomal	(Kopacek et al., 2000; Booth et al., 2004b; Sorensen et al., 2008)
	<i>IDE</i>	Inhibidor de proteasa	(Greenwood et al., 2005)
	<i>LZM</i>	Hidrolasa lisosomal	(Kopacek et al., 2000; Baker y Manuelidis, 2003)
	<i>MASP1</i>	Metalopectidasa	(Booth et al., 2004b)
<i>NDST1</i>	Endopeptidasa tipo serina/tripsina	(Booth et al., 2004b)	
<i>OSGEP</i>	Peptidasa tipo cisteína	(Booth et al., 2004b)	
<i>PAZG4</i>	Heparán sulfato de N-desacetilasa	(Booth et al., 2004b)	
<i>SERP/NA12</i>	Inhibidor de proteasa de cisteína/serina	(Greenwood et al., 2005)	
<i>SERP/NA3N</i>	Inhibidor de proteasa	(Xiang et al., 2004; Baker y Manuelidis, 2003)	

Tabla 2. Listado de genes con expresión diferencial en tejido nervioso de individuos con EETs (continuación)
 Table 2. List of genes with differential expression in nervous tissue of individuals with TSEs (continuation)

Grupo de genes	Gen	Función	Citas
	<i>SERPINB2</i>	Inhibidor de proteasa	(Baker y Manuelidis, 2003)
	<i>SPINT2</i>	Inhibidor de proteasa	(Baker y Manuelidis, 2003)
	<i>TIMP1</i>	Inhibidor de proteasa	(Xiang et al., 2004)
	<i>TIMP1</i>	Inhibidor de proteasa	(Baker y Manuelidis, 2003)
	<i>TPP1</i>	Proteasa lisosomal	(Baker y Manuelidis, 2003)
	<i>UCHL5</i>	Proliferación asociada 2G4	(Booth et al., 2004b; Sorensen et al., 2008)
Genes codificantes de chaperonas	<i>CALR</i>	Plegamiento de proteínas	(Baker y Manuelidis, 2003)
	<i>CLU</i>	Transporte y proteína de unión	(Booth et al., 2004a; Greenwood et al., 2005; Sorensen et al., 2008; Tang et al., 2009)
	<i>HSP1</i>	Plegamiento de proteínas	(Booth et al., 2004a)
	<i>A-HSPCA</i>	Plegamiento de proteínas	(Greenwood et al., 2005)
	<i>HSP105A</i>	Factor de choque térmico	(Riemer et al., 2004)
	<i>HSP70 1A</i>	Plegamiento de proteínas	(Doh-ura et al., 1995; Booth et al., 2004a; Xiang et al., 2004)
	<i>HSP90</i>	Plegamiento de proteínas	(Doh-ura et al., 1995)
	<i>HSPA, HSPA9A</i>	Plegamiento de proteínas	(Booth et al., 2004b; Greenwood et al., 2005)
	<i>MTOR</i>	Isomerasa, plegamiento de proteínas	(Greenwood et al., 2005)

peranzadores y nos inducen a pensar que la realización de estudios más profundos de los genes descritos como potenciales biomarcadores conducirá a la identificación de más moléculas diagnósticas.

La mayoría de los estudios de perfiles de expresión se han realizado después de que aparezcan los síntomas clínicos de la enfermedad, sin embargo, las enfermedades priónicas y otras enfermedades neurodegenerativas presentan una larga fase presintomática. Por ello, se necesitan estudios de expresión genómica en estadios preclínicos y clínicos que permitan identificar nuevos genes, proteínas y rutas implicadas en la patogénesis de las EETs y útiles como marcadores de diagnóstico preclínico.

El análisis del transcriptoma del SNC de individuos infectados por priones ha permitido identificar tres grandes grupos de factores implicados en las EETs: (1) genes implicados en el metabolismo lipídico, (2) genes codificantes de proteasas e inhibidores de proteasa y (3) genes codificantes de chaperonas (Tabla 2).

Genes implicados en el metabolismo lipídico

Los análisis de expresión genómica han mostrado variación en genes involucrados en el metabolismo de los lípidos tanto en modelos murinos de la enfermedad como en cultivos celulares. En distintas áreas del encéfalo de ratones infectados con scrapie se subexpresan varios genes implicados en la biosíntesis del colesterol (Riemer et al., 2004; Sorensen et al., 2008) y de otros lípidos, como los genes codificantes de la proteína de unión con el elemento regulador de los esteroides (*Srebp*) y de la proteína de activación de escisión (*Scap*) (Booth et al., 2004a). Estos cambios podrían ser responsables de la disminución de la síntesis de colesterol observada en el encéfalo de animales afectados por scrapie, hecho que probablemente se reforzaría por la sobreexpresión del gen *Abca1* (Riemer et al.,

2004), codificante de la proteína reguladora del flujo de salida del colesterol, que favorece el transporte del mismo y su posterior unión a apolipoproteínas, y por la sobreexpresión de estas últimas (Booth et al., 2004b).

Los genes implicados en el metabolismo lipídico también se encuentran alterados en el cultivo celular de microglía infectado por ECJ (Baker y Manuelidis, 2003). La proteína amiloide del suero A3 (SAA3) (el constituyente principal de las lipoproteínas de alta densidad durante las reacciones inflamatorias) se encuentra incrementada en cultivos de microglía infectada por ECJ y puede afectar al almacenamiento y a la liberación del colesterol (Ely et al., 2001). En contraste, el aumento de niveles de expresión de la apolipoproteína C1 (*APOC1*), que también está relacionada con otras enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (Petit-Turcotte et al., 2001), puede inhibir tanto la captación de LDL (lipoproteínas de baja densidad) como la actividad de la lipoproteína lipasa. La variación en la expresión de genes implicados en el metabolismo lipídico tiene una gran importancia en las enfermedades priónicas, debido a que los lípidos pueden actuar como lipochaperonas para provocar el plegamiento de las proteínas de la membrana y también de la proteína prion (Sanders y Nagy, 2000; Sarnataro et al., 2004; Campana et al., 2006). Finalmente, estudios genéticos de *APOE* han demostrado que algunas de las variantes de este gen podrían considerarse como un factor de riesgo para la susceptibilidad a la ECJ (Amouyel et al., 1994).

Nuestros resultados de expresión génica en ovejas infectadas de forma natural con scrapie en fase clínica demuestran sobreexpresión de dos genes implicados en el transporte lipídico, la apolipoproteína C4 (*APOC4*) y la esteroil O-aciltransferasa 1 (*SOAT1*) (Filali et al., 2011). Además de la apolipoproteína E, que se ha identificado como un biomarcador en la enfermedad de Parkinson (Dufek et al.,

2009) muchos miembros de la familia de apolipoproteínas (*Apoa1*, *Apoa4*, *Apoc1*, *Apoc2*, *Apoc3* y *Apod*) han sido descritas como potenciales biomarcadores en las prionopatías (Booth et al., 2004b; Skinner et al., 2006). *APOC4* podría ser un nuevo miembro de esta familia de genes asociado con la neuropatología del scrapie.

Asimismo, la variación en la esteroil O-aciltransferasa 1, que ayuda en el metabolismo del colesterol, se ha descrito en la enfermedad de Alzheimer (Carter, 2007) y también se ha visto sobreexpresada en casos de scrapie natural (Filali et al., 2011). Otros genes implicados en el metabolismo de ácidos grasos y lipoproteínas como *CD36* y *CD68* también se sobreexpresan en casos de scrapie natural en las fases clínica (Filali et al., 2011) y preclínica (Datos no publicados).

Genes codificantes de proteasas e inhibidores de proteasa

Muchas catepsinas (tipo S, H, C, D y Z) e inhibidores de proteasas (por ejemplo, la cistatina F, inhibidora de cisteína-proteasas) se sobreexpresan en los encéfalos de ratones infectados por scrapie y en las células de microglía infectadas por ECJ (Dandoy-Dron et al., 1998; Baker y Manuelidis, 2003; Booth et al., 2004b; Xiang et al., 2004; Skinner et al., 2006). Asimismo, se ha descrito la sobreexpresión de la catepsina H en la fase clínica de casos naturales del scrapie (Filali et al., 2011). Las catepsinas podrían estar relacionadas con el proceso neurodegenerativo y citotóxico generado por la inducción de la apoptosis y de la degradación de las proteínas de la matriz extracelular (MEC) (Nakanishi, 2003). También podrían ejercer su efecto sobre la replicación de priones; se ha observado que los inhibidores de la cisteína-proteasas bloquean la acumulación de la PrP^{Sc} (Doh-Ura et al., 2000), lo que sugiere que las proteasas podrían promover la replicación de priones mediante la ruptura de los grandes agrega-

dos de amiloide de prión formando nuevas semillas de PrP^{Sc} (análogo al efecto de la sonicación en la PMCA).

Además de las diferencias de expresión observadas para las catepsinas en el transcurso de las enfermedades priónicas, diversos estudios han tratado de asociar distintas variantes de la catepsina D a un mayor riesgo a padecer la ECJ o a un descenso de la supervivencia, sin resultados concluyentes (Bishop et al., 2008; Jeong et al., 2009; Kovacs et al., 2010).

Genes codificantes de chaperonas

Los datos de microarrays procedentes de muestras de encéfalos de ratones infectados por diferentes cepas de scrapie (ME7, 79A, y 22A) han mostrado grandes diferencias en la expresión de muchas chaperonas. Las chaperonas que presentan una expresión diferencial específica de cepa son el gen de la proteína de choque térmico de 70 KDa1A (*Hspa1a*) (una chaperona ubicua) y la calreticulina (*Calr*) (una chaperona del retículo endoplasmático) (Booth et al., 2004a). La expresión de otras chaperonas se ha visto modificada en cultivos celulares (células N2a) infectados con priones, donde el gen de la proteína de choque térmico de 70 KDa (*Hsp70*) se sobreexpresa y el de la proteína de choque térmico de 90 KDa (*Hsp90*) se subexpresa (Doh-ura et al., 1995). Asimismo, varios genes implicados en la respuesta celular al estrés y al plegamiento de proteínas, como el gen de la proteína de choque térmico 9 (*Hspa9*), *Calr* y peptidil-prolil cis-trans isomerasa (*Fkbp*), también se muestran alterados en células infectadas por priones (Greenwood et al., 2005). Además, en casos naturales de scrapie, se ha detectado una disminución en el nivel de expresión de *HSPB1* y *HSP90AA1* a nivel de corteza frontal del cerebro, y un aumento de la expresión de la *HSP73* a nivel de diencéfalo (Serrano et al., 2011). Asimismo, la asociación estadística entre los niveles de expresión de las chaperonas y los valores semi-

cuantitativos del depósito de la proteína prión, gliosis y espongirosis sugiere que las Hsp parecen estar implicadas en la gliosis, y no en reacciones anti-apoptóticas. Sin embargo, las células de Purkinje muestran gran expresión de las proteínas HSP70 y HSP90, presentando la HSP70 una asociación negativa con el depósito de la proteína prión y con la espongirosis, sugiriendo que las chaperonas ejercen un efecto neuroprotector en las células de Purkinje frente al estrés relacionado con el scrapie ovino (Serrano et al., 2011).

Además de los estudios de expresión, debido a su localización en una región QTL, se propuso el gen *HSP90AA1* como candidato a modular la susceptibilidad a scrapie (Marcos-Carcavilla et al., 2008a). Posteriormente se determinó que ciertos polimorfismos de este gen podrían explicar las diferencias en el periodo de incubación de scrapie observadas entre individuos con igual genotipo para el gen *PRNP* (Marcos-Carcavilla et al., 2010).

Biomarcadores genómicos en tejido linfoide

La vía de transmisión principal del scrapie y otras EETs como la EEB y la vECJ ha sido la infección del individuo por ingesta de alimentos contaminados con proteína priónica por vía oral. Tras la toma de alimentos contaminados, la PrP^{Sc} se transporta desde el intestino hasta el sistema nervioso central. Los datos actuales sugieren que la PrP^{Sc} atraviesa el epitelio intestinal, posiblemente a través de las células M, y se acumula rápidamente en el tejido linfoide asociado al intestino (GALT), principalmente en la placa de Peyer de la mucosa intestinal, en los ganglios linfáticos mesentéricos y posteriormente en el bazo (van Keulen et al., 2002). La linfoinvasión por el agente causal tras la ingestión del mismo constituye un hecho atractivo para la identificación de biomarcadores en la investigación de las enfermedades priónicas. Este proceso ocurre en la fase preclínica, antes de

la neuroinvasión, por lo que se puede considerar un momento óptimo para el diagnóstico precoz o para una potencial intervención terapéutica (Aucouturier y Carnaud, 2002). Asimismo, una ventaja adicional del tejido linfoide como tejido diana de diagnóstico, con respecto al SNC, es su mayor accesibilidad para el muestreo mediante la realización de biopsias. A pesar de ello, se han publicado muy pocos estudios que describan biomarcadores genómicos o proteicos asociados a la replicación del prión en el SLR. Un estudio relativamente reciente ha identificado cambios en la expresión de los genes *St6gal1*, *St3gal5*, *Man2a1*, *Hexb*, *Pigq* y genes relacionados con la glicosilación en el bazo de ratones infectados por scrapie (Sasaki et al., 2006), sugiriendo que la modificación en el metabolismo de los glicosfingolípidos del bazo está asociada con la acumulación de la proteína prión. Otros estudios sobre cambios en la expresión génica, utilizando muestras de placas de Peyer de ovinos infectados experimentalmente, describen alteraciones de genes involucrados en distintas funciones del sistema inmune (complejo mayor de la histocompatibilidad (MHC) de clase II y L-RAP), en procesos inflamatorios (proteína similar a la asociada a la pancreatitis (PAP-like)) (Austbo et al., 2008) y en otros procesos celulares y metabólicos, incluyendo el desarrollo y la maduración de los linfocitos (Khaniya et al., 2009).

Entre el limitado número de potenciales biomarcadores identificados en estos estudios, podemos destacar el factor asociado a la diferenciación eritroide (*EDRF*) que se describió como biomarcador específico de las EETs en la fase clínica de la enfermedad en tejido linfoide (Miele et al., 2001). Este biomarcador se subexpresaba en bazo, médula ósea y sangre de ratones infectados con scrapie, bovino con BSE y ovino con scrapie. Sin embargo Glock et al. (2003) mostraron que *EDRF* presenta un alto grado de variación transcripcional en la sangre humana de personas sanas poniendo en cuestión la utilidad de este biomarcador.

Validación de los biomarcadores génicos

Las diferencias entre los niveles de transcripción de un gen y la cantidad final de proteína expresada pueden ser importantes. Esto puede ser debido a distintos factores, como los errores experimentales, la estructura secundaria del RNA, su estabilidad o la vida media del RNA, entre otros (Maier et al., 2009). En consecuencia, se requiere una validación funcional convincente mediante cuantificación proteica. El proceso de validación de los biomarcadores incluye estudios que añadan información y confianza a estos potenciales biomarcadores. Existen biomarcadores cuyos efectos deben estar relacionados principalmente con la deposición de la PrP^{Sc}, la neuropatología y el carácter infeccioso del prión (Lloyd et al., 2011). No obstante, se requieren estudios experimentales antes de utilizar estas moléculas como biomarcadores o dianas terapéuticas en ensayos clínicos (Huzarewich et al., 2010). Se deben utilizar técnicas de cuantificación o semi-cuantificación proteica para determinar el nivel de proteínas codificadas por los genes que presentan altos niveles de regulación a nivel transcripcional. Las técnicas de inmunoensayo (ELISA, inmunohistoquímica (IHQ) o WB) son las más utilizadas para la validación funcional de un potencial biomarcador génico. Como ejemplos de genes validados a nivel funcional, citaremos el *SCRG1* (gen con respuesta a scrapie 1), que se sobreexpresa en modelos experimentales de scrapie y BSE (Dandoy-Dron et al., 1998; Dandoy-Dron et al., 2000). Posteriormente, en modelos murinos de scrapie, la proteína codificada por este gen se ha visto relacionada tanto con el estrés y la muerte neuronal como con el proceso de la autofagia (Dron et al., 2005). Además del *Scrg1*, nuestro grupo ha analizado seis biomarcadores potenciales de scrapie (*CAPN6*, *COL1A2*, *COL3A1*, *GALA1*, *MT2A* y *MTNR1B*) a nivel funcional (Filali et al., 2013), validando los cambios en el nivel de expresión proteica de *CAPN6*, *GALA1*, *MTNR1B* y *MT2A*, confirmando su posible uso como biomarcadores de las EETs o dianas terapéuticas.

Biomarcadores proteómicos

En las EETs humanas y animales se han descubierto pocos biomarcadores proteicos mediante las técnicas de proteómica. Entre estos biomarcadores, en casos de ECJ se han descrito la α 1-antiquimotripsina (α 1-ACT), la cistatina C, la proteína transportadora de ácidos grasos específica del miocardio (H-FABP), la proteína 14-3-3, la transtiretina, S-100 β y Tau (Otto et al., 1998; Green et al., 2001; Green et al., 2002; Guillaume et al., 2003; Sanchez et al., 2004; Brechlin et al., 2008; Miele et al., 2008); y en los casos de EEB el péptido antimicrobiano de la catelicidina, la clusterina, la región de la cadena C de la Ig Gamma-2 y la uroguanilina (Simon et al., 2008).

Se han identificado proteínas en el LCR que están siendo muy útiles en el diagnóstico de enfermedades priónicas humanas. Una de ellas, la proteína 14-3-3, es una proteína neuronal que se libera al LCR tras la agresión neuronal. Su detección en LCR por Western Blot (WB) se utiliza principalmente como prueba de diagnóstico de ECJ, en conjunto con los indicadores clínicos de esta enfermedad (Blennow et al., 2005). La acumulación de la proteína 14-3-3 es altamente indicativa de la ECJ esporádica, detectando esta enfermedad con una especificidad de 92% y una sensibilidad del 96% (Green, 2002). Sin embargo, la proteína 14-3-3 es un pobre marcador de la vECJ, donde sólo se detectan el 50% de los pacientes con vECJ confirmada (Green, 2002). Esta proteína se utiliza como uno de los parámetros de diferenciación entre estas dos formas de la ECJ.

Otras proteínas sobreexpresadas en el LCR en pacientes con ECJ son Tau y fosfo-Tau, S-100 β y la enolasa específica de neuronas (NSE). La determinación de los niveles de proteína total Tau en el LCR de pacientes con ECJ, mediante el uso de un kit comercial de ELISA, indica que como marcador de diagnóstico de ECJ la proteína Tau es comparable con la proteína 14-3-3 (Otto et al., 1997; Otto et al.,

2002). La concentración de proteína Tau también está elevada en LCR de pacientes con vECJ (Green *et al.*, 2001). Estos biomarcadores han demostrado ser muy útiles en la confirmación de los casos de ECJ, y su uso generalizado ilustra el importante papel que desempeñan los biomarcadores distintos de la PrP^{Sc} en la detección de las enfermedades priónicas (Parveen *et al.*, 2005).

Un biomarcador proteico identificado más recientemente ha sido la $\alpha 1$ -ACT. En principio se detectó la expresión aumentada del gen que codifica esta proteína en el cerebro de ratones infectados con scrapie en estadios preclínicos (Miele *et al.*, 2008). Esta proteína se había relacionado con la patología de Alzheimer (Abraham *et al.*, 1988) y aparecía elevada en el LCR de pacientes con esta enfermedad (Wang *et al.*, 2002). Finalmente, se describió que los niveles de $\alpha 1$ -ACT se incrementan drásticamente en la orina de los pacientes que sufren de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica, y aumentan progresivamente a lo largo de la enfermedad (Miele *et al.*, 2008). El aumento de la excreción de $\alpha 1$ -ACT también se ha descrito en EETs animales (Greenwood *et al.*, 2005). Por lo tanto, la medición de los niveles de $\alpha 1$ -ACT urinario puede ser un biomarcador muy útil para el seguimiento de las EETs (Miele *et al.*, 2008).

Hasta el momento, los biomarcadores proteómicos más relevantes por su utilidad en la confirmación de los casos de ECJ son la alpha 1-antiquimotripsina, la proteína 14-3-3 y la proteína Tau.

El uso de la técnica de microarray de anticuerpos no se ha utilizado todavía en estudios de las EETs, sin embargo esta técnica se ha usado en la investigación de la enfermedad de Alzheimer (Ray *et al.*, 2007). La Tabla 3 resume los principales biomarcadores potenciales para las EETs y otras enfermedades neurodegenerativas, identificados en fluidos corporales mediante las técnicas de espectrometría de masas y electroforesis bidimensional.

Conclusión

Las EETs siguen siendo un campo abierto para la investigación en lo que se refiere a la naturaleza del agente causal, la patogenia de estas enfermedades, la naturaleza de las cepas priónicas, las diferencias individuales en susceptibilidad, el diagnóstico precoz y la terapia eficaz. La búsqueda de biomarcadores asociados a scrapie, a otras EETs e incluso a otras enfermedades neurodegenerativas, constituye una estrategia prometedora para responder a muchas de estas cuestiones. Aunque las investigaciones realizadas en diversos tejidos de individuos afectados por enfermedades priónicas han identificado numerosos genes asociados con la infección priónica, se han identificado muy pocos cambios génicos con potencial uso como biomarcadores específicos de las EETs, entre los que podemos destacar $\alpha 1$ -ACT y *CST3*. La validación de más genes como biomarcadores requiere el estudio de las proteínas codificadas por los mismos y la realización de estudios funcionales. Igualmente, el número de proteínas que puedan reemplazar a las PrP^{Sc} como biomarcadores de la enfermedad es limitado, destacando por su utilidad la proteína 14-3-3 y la Tau.

Los retos para el futuro próximo consistirán en profundizar en el estudio proteico de los potenciales biomarcadores génicos ya identificados y también en la aplicación de las nuevas técnicas de genómica y proteómica en el estudio de tejidos de animales infectados de forma natural con agentes priónicos de distintas EETs, en particular en los tejidos de mayor accesibilidad, y en distintas fases clínicas de la enfermedad para identificar nuevas moléculas relevantes en el estudio de estas enfermedades.

Tabla 3. Biomarcadores potenciales de EETs y otras Enfermedades Neurodegenerativas identificados por espectrometría de masas y electroforesis bidimensional
Table 3. Potential biomarkers of TSEs and other neurodegenerative diseases identified by mass spectrometry and two-dimensional electrophoresis

Biomarcador	Fluido	Enfermedad*	Referencia
α -1-glicoproteína ácida	Suero	EA	(Zhang et al., 2004; Dufek et al., 2009)
α -1-antiquimotripsina	Orina	ECJ	(Miele et al., 2008)
Apolipoproteína B100	Suero	EA	(Zhang et al., 2004; Dufek et al., 2009)
α -Alfa-2 macroglobulina	Plasma y suero	EA	(Zhang et al., 2004; Hye et al., 2006; Dufek et al., 2009)
Apolipoproteína E	Suero y LCR	EA y EP	(Zhang et al., 2004; Rite et al., 2007; Dufek et al., 2009)
Cadena α -2 de la haptoglobina	Suero y LCR	EA y EP	(Zhang et al., 2004; Rite et al., 2007; Dufek et al., 2009)
Cadena α -2 de la hemoglobina	Suero	EA	(Zhang et al., 2004; Dufek et al., 2009)
Clusterina	Orina, LCR, sangre y plasma	EEB y EA	(Sasaki et al., 2002; Simon et al., 2008)
Complemento C4	Suero	EA	(Zhang et al., 2004; Dufek et al., 2009)
Componente C3c del complemento	Suero	EA, ELA y EP	(Zhang et al., 2004; Goldknopf et al., 2006; Dufek et al., 2009)
Componente C3dg del complemento	Suero	ELA y EP	(Goldknopf et al., 2006)
Cistatina C	LCR	ECJ	(Sanchez et al., 2004)
Factor h del complemento	Suero y plasma	EA, ELA y EP	(Zhang et al., 2004; Goldknopf et al., 2006; Hye et al., 2006; Dufek et al., 2009)
Fragmento Bb del factor b del complemento	Suero	EP	(Goldknopf et al., 2006)

* EA: Enfermedad de Alzheimer, EEB: Encefalopatía espongiiforme bovina, ECJ: Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, ELA: Esclerosis lateral amiotrófica y EP: Enfermedad de Parkinson.

Tabla 3. Biomarcadores potenciales de EETs y otras Enfermedades Neurodegenerativas identificados por espectrometría de masas y electroforesis bidimensional (continuación)
 Table 3. Potential biomarkers of TSEs and other neurodegenerative diseases identified by mass spectrometry and two-dimensional electrophoresis (continuation)

Biomarcador	Fluido	Enfermedad*	Referencia
Glicoproteína rica en histidina	Suero	EA	(Zhang et al., 2004; Dufek et al., 2009)
Ig Gamma-2 región de la cadena C	Orina	EEB	(Simon et al., 2008)
Péptido microbial de la catelicidina	Orina	EEB	(Simon et al., 2008)
Precursor de la vitronectina	Suero	EA	(Zhang et al., 2004; Dufek et al., 2009)
Proteína transportadora de ácidos grasos específica del miocardio (H-FABP)	LCR y plasma	EA y ECJ	(Guillaume et al., 2003)
Proteína 14-3-3	LCR	ECJ	(Green, 2002)
Proteína Tau	LCR	ECJ	(Otto et al., 2002)
S-100 β	LCR	ECJ	(Otto et al., 1998)
Transtiretina	Suero y CSF	EA, ECJ y EP	(Zhang et al., 2004; Rite et al., 2007; Brechlin et al., 2008; Dufek et al., 2009)
Uroguanilina	Orina	EEB	(Simon et al., 2008)
Vitronectina subunidad 10 kDa	Suero	EA	(Zhang et al., 2004; Dufek et al., 2009)

* EA: Enfermedad de Alzheimer, EEB: Encefalopatía espongiiforme bovina, ECJ: Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, ELA: Esclerosis lateral amiotrófica y EP: Enfermedad de Parkinson.

Bibliografia

- Abraham CR, Selkoe DJ, Potter H (1988). Immunohistochemical identification of the serine protease inhibitor alpha 1-antichymotrypsin in the brain amyloid deposits of Alzheimer's disease. *Cell* 52: 487-501.
- Aguzzi A (2006). Prion diseases of humans and farm animals: epidemiology, genetics, and pathogenesis. *Journal of Neurochemistry* 97: 1726-1739.
- Aguzzi A, Falsig J (2012). Prion propagation, toxicity and degradation. *Nature Neuroscience* 15: 936-939.
- Amouyel P, Vidal O, Launay JM, Laplanche JL (1994). The Apolipoprotein-E Alleles as Major Susceptibility Factors for Creutzfeldt-Jakob-Disease. *Lancet* 344: 1315-1318.
- Andreoletti O, Berthon P, Marc D, Sarradin P, Grosclaude J, van Keulen L, Schelcher F, Elsen J, Lantier F (2000). Early accumulation of PrPsc in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *Journal of General Virology* 81: 3115-3126.
- Andreoletti O, Litaize C, Simmons H, Corbiere F, Lugan S, Costes P, Schelcher F, Vilette D, Grassi J, Lacroux C (2012). Highly efficient prion transmission by blood transfusion. *PLoS Pathogens* 8: e1002782.
- Aucouturier P, Carnaud C (2002). The immune system and prion diseases: a relationship of complexity and blindness. *Journal of Leukocyte Biology* 72: 1075-1083.
- Austbo L, Kampmann A, Muller-Ladner U, Neumann E, Olsaker I, Skretting G (2008). Identification of differentially expressed genes in ileal Peyer's patch of scrapie-infected sheep using RNA arbitrarily primed PCR. *BMC Veterinary Research* 4: 12.
- Baker CA, Manuelidis L (2003). Unique inflammatory RNA profiles of microglia in Creutzfeldt-Jakob disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 675-679.
- Basu U, Almeida LM, Dudas S, Graham CE, Czub S, Moore SS, Guan le L (2012). Gene expression alterations in Rocky Mountain elk infected with chronic wasting disease. *Prion* 6: 282-301.
- Bishop MT, Kovacs GG, Sanchez-Juan P, Knight RSG (2008). Cathepsin D SNP associated with increased risk of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *BMC Medical Genetics* 9.
- Blennow K, Johansson A, Zetterberg H (2005). Diagnostic value of 14-3-3beta immunoblot and T-tau/P-tau ratio in clinically suspected Creutzfeldt-Jakob disease. *International Journal of Molecular Medicine* 16: 1147-1149.
- Booth S, Bowman C, Baumgartner R, Dolenko B, Sorensen G, Robertson C, Coulthart M, Phillipson C, Somorjai R (2004a). Molecular classification of scrapie strains in mice using gene expression profiling. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 325: 1339-1345.
- Booth S, Bowman C, Baumgartner R, Sorensen G, Robertson C, Coulthart M, Phillipson C, Somorjai RL (2004b). Identification of central nervous system genes involved in the host response to the scrapie agent during preclinical and clinical infection. *Journal of General Virology* 85: 3459-3471.
- Brechlin P, Jahn O, Steinacker P, Cepek L, Kratzin H, Lehnert S, Jesse S, Mollenhauer B, Kretzschmar HA, Wiltfang J, Otto M (2008). Cerebrospinal fluid-optimized two-dimensional difference gel electrophoresis (2-D DIGE) facilitates the differential diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Proteomics* 8: 4357-4366.
- Bremer J, Baumann F, Tiberi C, Wessig C, Fischer H, Schwarz P, Steele AD, Toyka KV, Nave KA, Weis J, Aguzzi A (2010). Axonal prion protein is required for peripheral myelin maintenance. *Nature Neuroscience* 13: 310-U319.
- Brown AR, Webb J, Rebus S, Williams A, Fazakerley JK (2004). Identification of up-regulated genes by array analysis in scrapie-infected mouse brains. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 30: 555-567.
- Campana V, Sarnataro D, Fasano C, Casanova P, Paladino S, Zurzolo C (2006). Detergent-resistant membrane domains but not the proteasome are involved in the misfolding of a PrP mutant retained in the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Science* 119: 433-442.

- Carter CJ (2007). Convergence of genes implicated in Alzheimer's disease on the cerebral cholesterol shuttle: APP, cholesterol, lipoproteins, and atherosclerosis. *Neurochemistry International* 50: 12-38.
- Coleman BM, Hanssen E, Lawson VA, Hill AF (2012). Prion-infected cells regulate the release of exosomes with distinct ultrastructural features. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 26: 4160-4173.
- Cookson W, Liang L, Abecasis G, Moffatt M, Lathrop M (2009). Mapping complex disease traits with global gene expression. *Nature Reviews Genetics* 10: 184-194.
- Cosseddu GM, Andreoletti O, Maestrone C, Robert B, Ligios C, Piumi F, Agrimi U, Vaiman D (2007). Gene expression profiling on sheep brain reveals differential transcripts in scrapie-affected/not-affected animals. *Brain Research* 1142: 217-222.
- Dandoy-Dron F, Guillo F, Benboudjema L, Deslys JP, Lasmezas C, Dormont D, Tovey MG, Dron M (1998). Gene expression in scrapie. Cloning of a new scrapie-responsive gene and the identification of increased levels of seven other mRNA transcripts. *Journal of Biological Chemistry* 273: 7691-7697.
- Dandoy-Dron F, Benboudjema L, Guillo F, Jaegly A, Jasmin C, Dormont D, Tovey MG, Dron M (2000). Enhanced levels of scrapie responsive gene mRNA in BSE-infected mouse brain. *Brain Research. Molecular Brain Research* 76: 173-179.
- Diaz C, Vitezica ZG, Rupp R, Andreoletti O, Elsen JM (2005). Polygenic variation and transmission factors involved in the resistance/susceptibility to scrapie in a Romanov flock. *Journal of General Virology* 86: 849-857.
- Diekstra FP, Saris CGJ, van Rheeën W, Franke L, Jansen RC, van Es MA, van Vught PWJ, Blauw HM, Groen EJM, Horvath S, Estrada K, Rivadeneira F, Hofman A, Uitterlinden AG, Robberecht W, Andersen PM, Melki J, Meisinger V, Hardiman O, Landers JE, Brown RH, Shatunov A, Shaw CE, Leigh PN, Al-Chalabi A, Ophoff RA, van den Berg LH, Veldink JH (2012). Mapping of Gene Expression Reveals CYP27A1 as a Susceptibility Gene for Sporadic ALS. *PLoS ONE* 7.
- Doh-ura K, Perryman S, Race R, Chesebro B (1995). Identification of differentially expressed genes in scrapie-infected mouse neuroblastoma cells. *Microbial Pathogenesis* 18: 1-9.
- Doh-ura K, Iwaki T, Caughey B (2000). Lysosomotropic agents and cysteine protease inhibitors inhibit scrapie-associated prion protein accumulation. *Journal of Virology* 74: 4894-4897.
- Dron M, Bailly Y, Beringue V, Haeberle AM, Grifond B, Risold PY, Tovey MG, Laude H, Dandoy-Dron F (2005). Scrg1 is induced in TSE and brain injuries, and associated with autophagy. *European Journal of Neuroscience* 22: 133-146.
- Dufek M, Hamanova M, Lokaj J, Michalkova Z, Rektorova I, Goldemund D, Rektor I (2009). Serum inflammatory biomarkers in Parkinson's disease. *Journal of the Neurological Sciences* 285: S293-S294.
- Ely S, Bonatesta R, Ancsin JB, Kindy M, Kisilevsky R (2001). The in-vitro influence of serum amyloid A isoforms on enzymes that regulate the balance between esterified and un-esterified cholesterol. *Amyloid* 8: 169-181.
- Filali H, Martin-Burriel I, Harders F, Varona L, Lyahyai J, Zaragoza P, Pumarola M, Badiola JJ, Bossers A, Bolea R (2011). Gene expression profiling and association with prion-related lesions in the medulla oblongata of symptomatic natural scrapie animals. *PLoS ONE* 6: e19909.
- Filali H, Martin-Burriel I, Harders F, Varona L, Serrano C, Acin C, Badiola JJ, Bossers A, Bolea R (2012). Medulla oblongata transcriptome changes during presymptomatic natural scrapie and their association with prion-related lesions. *BMC Genomics* 13: 399.
- Filali H, Vidal E, Bolea R, Marquez M, Marco P, Vargas A, Pumarola M, Martin-Burriel I, Badiola JJ (2013). Gene and protein patterns of potential prion-related markers in the central nervous system of clinical and preclinical infected sheep. *Veterinary Research* 44: 14.
- Gamazon ER, Huang RS, Cox NJ, Dolan ME (2010). Chemotherapeutic drug susceptibility associated SNPs are enriched in expression quantitative trait loci. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 9287-9292.

- Gambetti P, Dong Z, Yuan J, Xiao X, Zheng M, Alsheklee A, Castellani R, Cohen M, Barria MA, Gonzalez-Romero D, Belay ED, Schonberger LB, Marder K, Harris C, Burke JR, Montine T, Wisniewski T, Dickson DW, Soto C, Hulette CM, Mastrianni JA, Kong Q, Zou WQ (2008). A novel human disease with abnormal prion protein sensitive to protease. *Annals of Neurology* 63: 697-708.
- Glock B, Winter M, Rennhofer SO, Brunholz E, Troscher D, Reisacher RB, Mayr WR (2003). Transcript level of erythroid differentiation-related factor, a candidate surrogate marker for transmissible spongiform encephalopathy diseases in blood, shows a broad range of variation in healthy individuals. *Transfusion* 43: 1706-1710.
- Goldknopf IL, Sheta EA, Bryson J, Folsom B, Wilson C, Duty J, Yen AA, Appel SH (2006). Complement C3c and related protein biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 342: 1034-1039.
- Gough KC, Maddison BC (2010). Prion transmission: prion excretion and occurrence in the environment. *Prion* 4: 275-282.
- Green AJE, Thompson EJ, Stewart GE, Zeidler M, McKenzie JM, MacLeod MA, Ironside JW, Will RG, Knight RSG (2001). Use of 14-3-3 and other brain-specific proteins in CSF in the diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry* 70: 744-748.
- Green AJE (2002). Use of 14-3-3 in the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Biochemical Society Transactions* 30: 382-386.
- Green AJE, Ramljak S, Muller WEG, Knight RSG, Schroder HCU-hwscsaBTG-BR-ccacbccd (2002). 14-3-3 in the cerebrospinal fluid of patients with variant and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease measured using capture assay able to detect low levels of 14-3-3 protein. *Neuroscience Letters* 324: 57-60.
- Greenwood AD, Horsch M, Stengel A, Vorberg I, Lutzny G, Maas E, Schadler S, Erfle V, Beckers J, Schatzl H, Leib-Mosch C (2005). Cell line dependent RNA expression profiles of prion-infected mouse neuronal cells. *Journal of Molecular Biology* 349: 487-500.
- Grizenkova J, Akhtar S, Collinge J, Lloyd SE (2010). The Retinoic Acid Receptor Beta (Rarb) Region of Mmu14 Is Associated with Prion Disease Incubation Time in Mouse. *PLoS ONE* 5.
- Guillaume E, Zimmermann C, Burkhard PR, Hochstrasser DF, Sanchez JC (2003). A potential cerebrospinal fluid and plasmatc marker for the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Proteomics* 3: 1495-1499.
- Guillerme-Bosselut F, Forestier L, Jayat-Vignoles C, Vilotte JL, Popa I, Portoukalian J, Le Dur A, Laude H, Julien R, Gallet PF (2009). Glycosylation-related gene expression profiling in the brain and spleen of scrapie-affected mouse. *Glycobiology* 19: 879-889.
- Hedman C, Lyahyai J, Filali H, Marin B, Serrano C, Monleon E, Moreno B, Zaragoza P, Badiola JJ, Martin-Burriel I, Bolea R (2012). Differential gene expression and apoptosis markers in presymptomatic scrapie affected sheep. *Veterinary Microbiology* 159: 23-32.
- Hunter N (2007). Scrapie: uncertainties, biology and molecular approaches. *Biochimica et Biophysica Acta* 1772: 619-628.
- Huzarewicz RL, Siemens CG, Booth SA (2010). Application of "omics" to prion biomarker discovery. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010: 613504.
- Hye A, Lynham S, Thambisetty M, Causevic M, Campbell J, Byers HL, Hooper C, Rijdsdijk F, Tabrizi SJ, Banner S, Shaw CE, Foy C, Poppe M, Archer N, Hamilton G, Powell J, Brown RG, Sham P, Ward M, Lovestone S (2006). Proteome-based plasma biomarkers for Alzheimer's disease. *Brain* 129: 3042-3050.
- Jeong BH, Lee KH, Lee YJ, Yun J, Park YJ, Bae Y, Kim YH, Cho YS, Choi EK, Carp RI, Kim YS (2009). Genetic Association of a Cathepsin D Polymorphism and Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 28: 302-306.
- Khaniya B, Almeida L, Basu U, Taniguchi M, Williams JL, Barreda DR, Moore SS, Guan LL (2009). Microarray analysis of differentially expressed genes from Peyer's patches of cattle orally challenged with bovine spongiform encephalo-

- pathy. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* 72: 1008-1013.
- Kopacek J, Sakaguchi S, Shigematsu K, Nishida N, Atarashi R, Nakaoke R, Moriuchi R, Niwa M, Katamine S (2000). Upregulation of the genes encoding lysosomal hydrolases, a perforin-like protein, and peroxidases in the brains of mice affected with an experimental prion disease. *Journal of Virology* 74: 411-417.
- Kovacs GG, Sanchez-Juan P, Strobel T, Schuur M, Poleggi A, Nocentini S, Giannattasio C, Belay G, Bishop M, Capellari S, Parchi P, Gelpi E, Gal A, Bakos A, Molnar MJ, Heinemann U, Zerr I, Knight RSG, Mitrova E, van Duijn C, Budka H (2010). Cathepsin D (C224T) Polymorphism in Sporadic and Genetic Creutzfeldt-Jakob Disease. *Alzheimer Disease and Associated Disorders* 24: 104-107.
- Lloyd S, Mead S, Collinge J (2011). Genetics of prion disease. *Topics in Current Chemistry* 305: 1-22.
- Lloyd SE, Maytham EG, Grizenkova J, Hummerich H, Collinge J (2010). A Copine family member, Cpne8, is a candidate quantitative trait gene for prion disease incubation time in mouse. *Neurogenetics* 11: 185-191.
- Maier T, Guell M, Serrano L (2009). Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Letters* 583: 3966-3973.
- Marcos-Carcavilla A, Calvo JH, Gonzalez C, Moazami-Goudarzi K, Laurent P, Bertaud M, Hayes H, Beattie AE, Serrano C, Lyahyai J, Martin-Burriel I, Serrano M (2008a). Structural and functional analysis of the HSP90AA1 gene: distribution of polymorphisms among sheep with different responses to scrapie. *Cell Stress & Chaperones* 13: 19-29.
- Marcos-Carcavilla A, Calvo JH, Gonzalez C, Serrano C, Moazami-Goudarzi K, Laurent P, Bertaud M, Hayes H, Beattie AE, Lyahyai J, Martin-Burriel I, Torres JM, Serrano M (2008b). Structural and functional analysis of the ovine laminin receptor gene (RPSA): Possible involvement of the LRP/LR protein in scrapie response. *Mammalian Genome* 19: 92-105.
- Marcos-Carcavilla A, Moreno C, Serrano M, Laurent P, Cribiu EP, Andreoletti O, Ruesche J, Weisbecker JL, Calvo JH, Moazami-Goudarzi K (2010). Polymorphisms in the HSP90AA1 5' flanking region are associated with scrapie incubation period in sheep. *Cell Stress and Chaperones* 15: 343-349.
- Matsumoto T, Samuel MD, Bollinger T, Pybus M, Coltman DW (2013). Association mapping of genetic risk factors for chronic wasting disease in wild deer. *Evol Appl* 6: 340-352.
- McGowan JP (1922). Scrapie in sheep. *Scottish Journal of Agriculture* 5: 365-375.
- Mead S, Poulter M, Uphill J, Beck J, Whitfield J, Webb TE, Campbell T, Adamson G, Deriziotis P, Tabrizi SJ, Hummerich H, Verzilli C, Alpers MP, Whittaker JC, Collinge J (2009). Genetic risk factors for variant Creutzfeldt-Jakob disease: a genome-wide association study. *Evolutionary Applications* 8: 57-66.
- Miele G, Manson J, Clinton M (2001). A novel erythroid-specific marker of transmissible spongiform encephalopathies. *Nature Medicine* 7: 361-364.
- Miele G, Seeger H, Marino D, Eberhard R, Heikenwalder M, Stoeck K, Basagni M, Knight R, Green A, Chianini F, Wuthrich RP, Hock C, Zerr I, Aguzzi A (2008). Urinary alpha1-antichymotrypsin: a biomarker of prion infection. *PLoS ONE* 3: e3870.
- Moreno CR, Lantier F, Lantier I, Sarradin P, Elsen JM (2003). Detection of new quantitative trait Loci for susceptibility to transmissible spongiform encephalopathies in mice. *Genetics* 165: 2085-2091.
- Moreno CR, Moazami-Goudarzi K, Briand S, Robert-Granie C, Weisbecker JL, Laurent P, Cribiu EP, Haley CS, Andreoletti O, Bishop SC, Pong-Wong R (2010). Mapping of quantitative trait loci affecting classical scrapie incubation time in a population comprising several generations of scrapie-infected sheep. *Journal of General Virology* 91: 575-579.
- Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods* 5: 621-628.

- Murdoch BM, Murdoch GK, Settles M, McKay S, Williams JL, Moore SS (2011). Genome-wide scan identifies loci associated with classical BSE occurrence. *PLoS ONE* 6: e26819.
- Nakanishi H (2003). Neuronal and microglial cathepsins in aging and age-related diseases. *Ageing Research Reviews* 2: 367-381.
- Ness SA (2007). Microarray analysis: basic strategies for successful experiments. *Molecular Biotechnology* 36: 205-219.
- Nicolae DL, Gamazon E, Zhang W, Duan SW, Dolan ME, Cox NJ (2010). Trait-Associated SNPs Are More Likely to Be eQTLs: Annotation to Enhance Discovery from GWAS. *PLoS Genetics* 6.
- Nicolas O, Gavin R, del Rio JA (2009). New insights into cellular prion protein (PrP^c) functions: The “ying and yang” of a relevant protein. *Brain Research Reviews* 61: 170-184.
- Otto M, Wiltfang J, Tumani H, Zerr I, Lantsch M, Kornhuber J, Weber T, Kretzschmar HA, Poser S (1997). Elevated levels of tau-protein in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuroscience Letters* 225: 210-212.
- Otto M, Wiltfang J, Schutz E, Zerr I, Otto A, Pfahlerberg A, Gefeller O, Uhr M, Giese A, Weber T, Kretzschmar HA, Poser S (1998). Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease by measurement of S100 protein in serum: prospective case-control study. *BMJ* 316: 577-582.
- Otto M, Wiltfang J, Cepek L, Neumann M, Mollenhauer B, Steinacker P, Ciesielezyk B, Schulz-Schaeffer W, Kretzschmar HA, Poser S (2002). Tau protein and 14-3-3 protein in the differential diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 58: 192-197.
- Parveen I, Moorby J, Allison G, Jackman R (2005). The use of non-prion biomarkers for the diagnosis of Transmissible Spongiform Encephalopathies in the live animal. *Veterinary Research* 36: 665-683.
- Petit-Turcotte C, Stohl SM, Beffert U, Cohn JS, Aumont N, Tremblay M, Dea D, Yang L, Poirier J, Shachter NS (2001). Apolipoprotein C-I expression in the brain in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease* 8: 953-963.
- Prusiner SB, Bolton DC, Groth DF, Bowman KA, Cochran SP, McKinley MP (1982). Further purification and characterization of scrapie prions. *Biochemistry* 21: 6942-6950.
- Ray S, Britschgi M, Herbert C, Takeda-Uchimura Y, Boxer A, Blennow K, Friedman LF, Galasko DR, Jutel M, Karydas A, Kaye JA, Leszek J, Miller BL, Minthon L, Quinn JF, Rabinovici GD, Robinson WH, Sabbagh MN, So YT, Sparks DL, Tabaton M, Tinklenberg J, Yesavage JA, Tibshirani R, Wyss-Coray T (2007). Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins. *Nature Medicine* 13: 1359-1362.
- Riemer C, Neidhold S, Burwinkel M, Schwarz A, Schultz J, Kratzschmar J, Monning U, Baier M (2004). Gene expression profiling of scrapie-infected brain tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 323: 556-564.
- Rite I, Arguelles S, Venero JL, Garcia-Rodriguez S, Ayala A, Cano J, Machado A (2007). Proteomic identification of biomarkers in the cerebrospinal fluid in a rat model of nigrostriatal dopaminergic degeneration. *Journal of Neuroscience Research* 85: 3607-3618.
- Rosenkranz R, Borodina T, Lehrach H, Himmelbauer H (2008). Characterizing the mouse ES cell transcriptome with Illumina sequencing. *Genomics* 92: 187-194.
- Sanchez JC, Guillaume E, Lescuyer P, Allard L, Carrette O, Scherl A, Burgess J, Corthals GL, Burkhard PR, Hochstrasser DF (2004). Cystatin C as a potential cerebrospinal fluid marker for the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Proteomics* 4: 2229-2233.
- Sanders CR, Nagy JK (2000). Misfolding of membrane proteins in health and disease: the lady or the tiger? *Current Opinion in Structural Biology* 10: 438-442.
- Sarnataro D, Campana V, Paladino S, Stornaiuolo M, Nitsch L, Zurzolo C (2004). PrP(C) association with lipid rafts in the early secretory pathway stabilizes its cellular conformation. *Molecular Biology of the Cell* 15: 4031-4042.
- Sasaki K, Doh-ura K, Ironside JW, Iwaki T (2002). Increased clusterin (apolipoprotein J) expression in human and mouse brains infected with

- transmissible spongiform encephalopathies. *Acta Neuropathologica* 103: 199-208.
- Sasaki K, Doh-ura K, Ironside J, Mabbott N, Iwaki T (2006). Clusterin expression in follicular dendritic cells associated with prion protein accumulation. *Journal of Pathology* 209: 484-491.
- Serrano C, Lyahyai J, Bolea R, Varona L, Monleon E, Badiola JJ, Zaragoza P, Martin-Burriel I (2009). Distinct spatial activation of intrinsic and extrinsic apoptosis pathways in natural scrapie: association with prion-related lesions. *Vet Res* 40: 42.
- Serrano C, Bolea R, Lyahyai J, Filali H, Varona L, Marcos-Carcavilla A, Acin C, Calvo JH, Serrano M, Badiola JJ, Zaragoza P, Martin-Burriel I (2011). Changes in HSP gene and protein expression in natural scrapie with brain damage. *Veterinary Research* 42: 13.
- Simon SL, Lamoureux L, Plews M, Stobart M, LeMaistre J, Ziegler U, Graham C, Czup S, Groschup M, Knox JD (2008). The identification of disease-induced biomarkers in the urine of BSE infected cattle. *Proteome Science* 6: 23.
- Skinner PJ, Abbassi H, Chesebro B, Race RE, Reilly C, Haase AT (2006). Gene expression alterations in brains of mice infected with three strains of scrapie. *BMC Genomics* 7: 114.
- Sorensen G, Medina S, Parchaliuk D, Phillipson C, Robertson C, Booth SA (2008). Comprehensive transcriptional profiling of prion infection in mouse models reveals networks of responsive genes. *BMC Genomics* 9: 114.
- Stephenson DA, Chiotti K, Ebeling C, Groth D, DeArmond SJ, Prusiner SB, Carlson GA (2000). Quantitative trait loci affecting prion incubation time in mice. *Genomics* 69: 47-53.
- Tang Y, Xiang W, Hawkins SA, Kretzschmar HA, Windl O (2009). Transcriptional changes in the brains of cattle orally infected with the bovine spongiform encephalopathy agent precede detection of infectivity. *Journal of Virology* 83: 9464-9473.
- Tortosa R, Castells X, Vidal E, Costa C, Ruiz de Villa Mdel C, Sanchez A, Barcelo A, Torres JM, Pumarola M, Arino J (2011). Central nervous system gene expression changes in a transgenic mouse model for bovine spongiform encephalopathy. *Veterinary Research* 42: 109.
- van Keulen LJ, Vromans ME, van Zijderveld FG (2002). Early and late pathogenesis of natural scrapie infection in sheep. *Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 110: 23-32.
- Wang X, DeKosky ST, Ikonovic MD, Kamboh MI (2002). Distribution of plasma alpha 1-antichymotrypsin levels in Alzheimer disease patients and controls and their genetic controls. *Neurobiology of Aging* 23: 377-382.
- Wilhelm BT, Marguerat S, Watt S, Schubert F, Wood V, Goodhead I, Penkett CJ, Rogers J, Bahler J (2008). Dynamic repertoire of a eukaryotic transcriptome surveyed at single-nucleotide resolution. *Nature* 453: 1239-1243.
- Wilson KE, Marouga R, Prime JE, Pashby DP, Orange PR, Crosier S, Keith AB, Lathe R, Mullins J, Estibeiro P, Bergling H, Hawkins E, Morris CM (2005). Comparative proteomic analysis using samples obtained with laser microdissection and saturation dye labelling. *Proteomics* 5: 3851-3858.
- Xiang W, Windl O, Wunsch G, Dugas M, Kohlmann A, Dierkes N, Westner IM, Kretzschmar HA (2004). Identification of differentially expressed genes in scrapie-infected mouse brains by using global gene expression technology. *Journal of Virology* 78: 11051-11060.
- Xiang W, Windl O, Westner IM, Neumann M, Zerr I, Lederer RM, Kretzschmar HA (2005). Cerebral gene expression profiles in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Annals of Neurology* 58: 242-257.
- Zhang RL, Barker L, Pinchev D, Marshall J, Rasamoeliso M, Smith C, Kupchak P, Kireeva I, Ingratta L, Jackowski G (2004). Mining biomarkers in human sera using proteomic tools. *Proteomics* 4: 244-256.

(Aceptado para publicación el 17 de mayo de 2013)