



Universidad
Zaragoza



IACS Instituto Aragonés de
Ciencias de la Salud

Trabajo Fin de Máster

Cambios epigenéticos en Esclerosis Múltiple: la metilación de los Retrovirus Endógenos Humanos (HERV-W) en precursores neuronales.

Epigenetic changes in Multiple Sclerosis: Methylation of Human Endogenous Retroviruses (HERV-W) in neuronal precursors.

Autor

Irene Serrano Gonzalo

Directores

Jon Schoorlemmer
Sofía Macías Redondo

Máster Universitario en Biología Molecular y Celular
Universidad de Zaragoza
Año académico 2017/2018

Índice

Abreviaturas.....	1
Resumen.....	3
Abstract.....	4
1. Introducción.....	5
1.1. Esclerosis múltiple (EM).....	5
1.2. Retrovirus endógenos humanos (HERVs).....	7
1.3. Regulación de los retrovirus endógenos humanos.....	10
1.4. Esclerosis múltiple y retrovirus endógenos humanos.....	10
1.5. Modelos celulares para el estudio de la EM.....	11
2. Hipótesis y objetivos.....	14
3. Materiales y métodos.....	15
3.1. Cultivo celular de la línea ES [4].....	15
3.1.1. Descongelación de la línea ES [4].....	15
3.1.2. Condiciones de cultivo y mantenimiento de la línea celular.....	15
3.1.3. Congelación de la línea ES [4].....	16
3.2. Generación de los precursores neuronales (Lt-NES).....	16
3.2.1. Formación de cuerpos embrioides (EBs).....	17
3.2.2. Formación de rosetas.....	18
3.2.3. Obtención de precursores neuronales (Lt-NES).....	19
3.2.4. Congelación de los precursores neuronales.....	20
3.2.5. Descongelación de los precursores neuronales.....	20
3.3. Generación de precursores neuronales (NPCs).....	20
3.3.1. Tratamiento de los NPCs con 5-Aza-2'-Deocitidina.....	22
3.4. Ensayos de expresión génica.....	23
3.4.1. Extracción de ARN.....	23
3.4.2. Obtención de cDNA.....	24
3.4.3. Expresión génica por PCR estándar.....	24
3.4.4. Expresión génica cuantitativa.....	25

3.5. Ensayos de metilación.....	26
3.5.1. Extracción de ADN genómico.....	26
3.5.2. Conversión con bisulfito.....	27
3.5.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	27
3.5.4. Pirosecuenciación.....	28
3.6. Ensayos de citometría de flujo.....	29
4. Resultados.....	31
4.1. Obtención de precursores neuronales (Lt-NES).....	31
4.1.1. Formación de EBs.....	31
4.1.2. Formación y selección de rosetas.....	32
4.1.3. Obtención de las células Lt-NES.....	34
4.2. Caracterización de los precursores neuronales (Lt-NES).....	36
4.2.1. Caracterización de las células Lt-NES mediante qPCR.....	37
4.2.2. Caracterización de las células Lt-NES por citometría de flujo.....	39
4.3. Obtención de los precursores neuronales (NPCs).....	41
4.3.1. Tratamiento con 5-Aza-2'-Deocitidina.....	41
4.4. Niveles de metilación de HERV-W/MSRV en el cromosoma 9.....	42
5. Discusión.....	49
5.1. Obtención de los precursores neuronales (Lt-NES).....	49
5.2. Caracterización de las células Lt-NES.....	49
5.3. Niveles de metilación de HERV-W/MSRV en el cromosoma 9.....	51
Conclusiones.....	52
Conclusions.....	53
Bibliografía.....	54
Anexos.....	59
Anexo 1: Cebadores PCR.....	59
Anexo 2: Cebadores qPCR.....	59
Anexo 3: Cebadores PCR previos a la pirosecuenciación.....	59

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
cDNA	ADN complementario
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Desoxinucleotidos
EBs	<i>Embryoid Bodies</i> (Cuerpos embrioides)
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> (Factor de crecimiento epidérmico)
EM	Esclerosis Múltiple
ERVWE-1	<i>Endogenous Retrovirus group W member 1</i> (Miembro 1 del grupo W de retrovirus endógenos)
FGF2	<i>Fibroblast Growth Factor 2</i> (Factor 2 de crecimiento fibroblástico)
g	Gramos
G	Fuerza centrífuga relativa
gDNA	ADN genómico
h	Horas
HERVs	<i>Human Endogenous Retroviruses</i> (Retrovirus endógenos humanos)
hESCs	<i>Human Embryonic Stem Cells</i> (Células madre embrionarias humanas)
iPSCs	<i>Induced pluripotent stem cells</i> (Células madre pluripotentes inducidas)
Lt-NES cells	<i>Long term neuroepithelial stem cells</i>
LTR	<i>Long terminal repeats</i> (Repeticiones terminales largas)
mg	Miligramos
Mg²⁺	Magnesio
MgCl₂	Cloruro de magnesio
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
MSRV	<i>Multiple Sclerosis associated retrovirus</i> (Retrovirus asociado a esclerosis múltiple)
NEEA	<i>Non-essential amino acids</i> (Aminoácidos no esenciales)
ng	Nanogramos
NPC	<i>Neural Progenitor Cells</i> (Células precursoras neuronales)
PBMCs	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> (Células mononucleares de sangre periférica)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampón fosfato salino)

REX1	<i>Reduced expression 1</i>
RI	<i>Rock Inhibitor</i>
s	Segundos
SFB	Suero Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervioso Central
SSEA	<i>Stage-specific embryonic antigen</i> (Antígeno específico del estado embrionario)
TE	Tris-EDTA
μl	Microlitros
μM	Micromolar
μg	Microgramos
αSSEA-4	Anticuerpo contra SSEA-4
αPAX6	Anticuerpo contra PAX6
αNESTIN	Anticuerpo contra NESTIN

RESUMEN

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad neurodegenerativa inflamatoria crónica y es la principal causa de discapacidad en jóvenes adultos. Actualmente, esta patología no tiene cura y esto se debe a que todavía su origen es una incógnita. Uno de los factores ambientales que se ha asociado a esta patología son los retrovirus endógenos humanos (HERVs). Los HERVs son copias defectuosas de retrovirus que constituyen un 8% del genoma humano. La familia de HERVs más asociada a la enfermedad es HERV-W. Dentro de esta familia, encontramos el retrovirus MSR/V (*Multiple sclerosis associated retrovirus*) cuyos niveles de proteína de envoltura (MSRV ENV) están elevados en lesiones cerebrales, líquido cefalorraquídeo y sangre de pacientes.

La metilación del ADN es un determinante de la expresión génica, tanto en el caso de genes clásicos, como en el caso de HERV. Siguiendo precedentes, que describen una relación inversa entre los niveles de metilación de HERV-Fc1 y sus niveles de expresión en pacientes con EM, se propuso estudiar la misma relación para el caso de HERVWChr9. Al verse afectado el sistema nervioso central (SNC) en esta patología, se decidió realizar el estudio en neuronas, generando modelos in vitro de las mismas. Partiendo de las células madre embrionarias humanas (hESCs) se llegó a la obtención de precursores neuronales mediante el seguimiento de dos protocolos distintos. Los precursores neuronales expresaron marcadores característicos como son SOX1, PAX6 y NESTIN.

Los niveles de metilación detectados en los precursores neuronales fueron muy elevados, del 90%. Este mismo análisis se realizó en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de pacientes con EM (n=5) y controles (n=5). Los niveles de metilación para ambos fueron del 80%, por lo que no se encontraron diferencias entre los grupos.

ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory neurodegenerative disease, and is the main cause of disability in young adults. Currently, there is no cure for this pathology and this is because its origin is still unknown. One of the environmental factors which has been related to this pathology are human endogenous retroviruses (HERVs). HERVs are defective copies of retroviruses which constitute 8% of the human genome. HERVs family most associated with MS disease is HERV-W. Within this family, we find the retrovirus MSR/V (*Multiple sclerosis associated retrovirus*) whose envelope protein (MSRV env) levels are elevated in brain lesions, cerebrospinal fluid and blood of MS patients.

DNA methylation is a determinant of gene expression in the case of both, classical genes and HERVs. Following precedents, which describe an inverse relationship between HERV-Fc1 methylation levels and their expression levels in MS patients, it was proposed to study the same relationship for HERVWChr9. Since the Central Nervous System (CNS) is affected in this pathology, the study was performed on neurons, generating in vitro models of them. Starting from hESCs an obtention of neuronal precursors was reached through the monitoring of two different protocols. Neuronal precursors expressed characteristic markers such as SOX1, PAX6 and *NESTIN*.

Methylation levels detected in neuronal precursors were very high, around 90%. This same analysis was performed on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of MS patients (n=5) and controls (n=5). Methylation levels to both were 80%, no differences were found between the groups.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Esclerosis múltiple (EM).

La Esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad crónica inflamatoria y degenerativa del sistema nervioso central (SNC) (1, 2). Fue descrita y acuñada con ese nombre en 1868 por el neurólogo francés Jean-Martin Charcot, y es considerada una de las principales causas de discapacidad en jóvenes adultos siendo la edad media de aparición entre los 20 y 40 años. En la actualidad, afecta alrededor de dos millones de personas en todo el mundo de las cuales el 75% son mujeres (3).

Se caracteriza por una respuesta autoinmune donde las vainas de mielina, sintetizadas por los oligodendrocitos, son atacadas debido a una activación indebida de los linfocitos T. La hipótesis más común sugiere que los linfocitos Th1 y Th17 juegan un papel principal con la liberación de citoquinas, como el interferon gamma (IFN- γ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). También el incremento de macrófagos, linfocitos T CD8+ y células B en el infiltrado inflamatorio, es clave en la patogénesis de esta enfermedad (4, 5).

La mielina es un componente lipoproteico que rodea los axones de las neuronas y su destrucción conlleva la desmielinización axonal. Esta desmielinización provoca una degeneración variable de los axones afectando al impulso nervioso, lo que se traduce en la aparición de síntomas. Los síntomas son amplios y variados, a menudo relacionados con la gravedad y forma de presentación de la enfermedad.

La esclerosis múltiple se puede dividir en diferentes clases según la aparición de brotes y la progresión de la enfermedad (Figura 1). Un brote es un concepto clínico que corresponde a la aparición o agravamiento de los síntomas propios de una disfunción neurológica, con una duración superior a 24 horas (6). Un 85% de los pacientes presentan la forma Recurrente remitente (RR) que cursa con la aparición de brotes y una recuperación completa o parcial. Algunos de los síntomas que pueden experimentar los pacientes son inestabilidad, problemas motores como ataxia o espasticidad, alteraciones visuales o del habla, vértigo y disfunción urinaria. Tras unos 10 años con la enfermedad, el 50% de los pacientes con la forma RR pasan a la forma Secundariamente progresiva (SP) donde hay una progresión no relacionada con los brotes y no hay remisión de los síntomas. Un 15% de los pacientes presentan una de las peores formas, la Primariamente progresiva (PP) que cursa sin brotes pero hay una progresión de la enfermedad desde el inicio con ocasionales estabilizaciones.

La última forma y más infrecuente es la Progresiva recidivante (PR) que también cursa con una progresión desde el inicio pero con brotes durante su evolución (7). Se ha establecido otro grupo denominado CIS (*Clinically isolated síndrome*) donde se encuentran los casos que han sufrido la primera manifestación neurológica de la enfermedad y donde estos eventos duran un máximo de 24 horas (8).

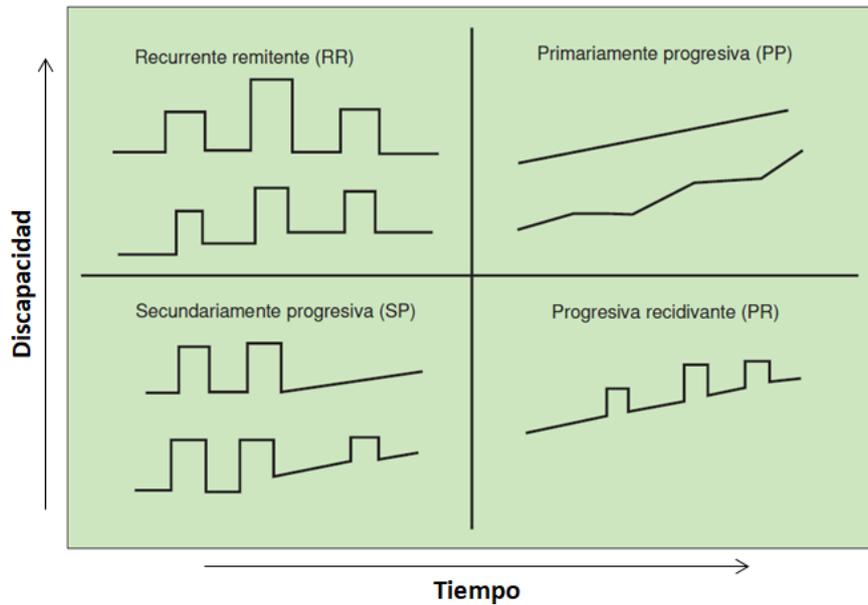


Figura 1: Formas clínicas de la esclerosis múltiple y su progresión en el tiempo. Las columnas representan los brotes. Imagen adaptada de Pericot et al. 2001 (9).

Actualmente, esta enfermedad neurodegenerativa no tiene cura al ser desconocido el origen de la misma, pero existen diversos tratamientos que retrasan su evolución y alivian sus síntomas. Estos tratamientos se distinguen en tres tipos (10). El primero está orientado al tratamiento de los brotes y se basa en el uso de glucocorticoides. El segundo está destinado a la prevención de la progresión y las recaídas, constituido por terapias con interferones (IFN- β) o con anticuerpos monoclonales (natalizumab). Y el último tipo es un tratamiento sintomático, por lo que los tratamientos varían en función de los síntomas que presente cada paciente.

Como se ha mencionado anteriormente, se desconoce cuál es el origen de la enfermedad pero la hipótesis es que tiene una etiología multifactorial, resultado de la interacción de factores medioambientales y genéticos. En relación con los factores genéticos, el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en el cromosoma 6p21.3 representa el locus con mayor susceptibilidad identificado hasta la fecha. Con estudios de asociación del genoma completo (GWAS) se han identificados diversas variantes. Entre ellas, los genes que codifican los receptores de la interleuquina 2 (IL2) e interleuquina 17 (IL17), receptores de la fracción Fc de las inmunoglobulinas o relacionados con el metabolismo de la vitamina D (3, 11).

Se han estudiado muchos factores ambientales de riesgo por una posible asociación con la enfermedad entre los que se incluyen el tabaquismo, la vitamina D y algunos agentes infecciosos. Dentro de estos agentes infecciosos encontramos la bacteria *Chlamydia pneumoniae*, el virus de Epstein-Barr (EBV), el virus herpes humano 6 (HHV6) y los retrovirus endógenos humanos (HERVs) (12, 13).

1.2. Retrovirus endógenos humanos (HERVs).

Los retrovirus son virus pertenecientes a la familia *Retroviridae*, que se caracterizan por contener como material genético ARN monocatenario de polaridad positiva. Estos virus se replican gracias a la célula huésped que infectan, a través de una forma intermedia de ADN bicatenario, que se inserta en el genoma del huésped por recombinación (14).

Este tipo de virus, normalmente infecta células somáticas y su transmisión es horizontal pero se cree, que hace millones de años estos virus llegaron a infectar células germinales haciendo que se transmitieran de forma vertical (Figura 2). Actualmente, estas secuencias de retrovirus que se transmiten a la descendencia se denominan retrovirus endógenos humanos (HERVs) y se clasifican dentro de los elementos transponibles del genoma ocupando cerca del 8% del mismo (13).

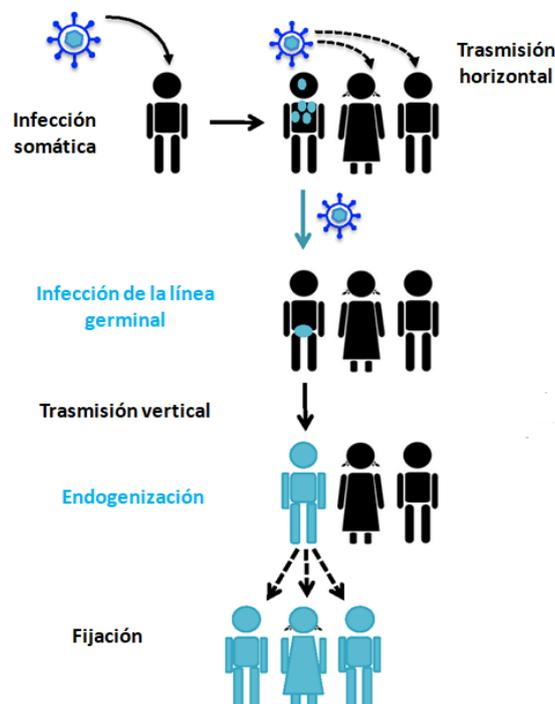


Figura 2: Endogenización de los retrovirus endógenos humanos (HERVs). Imagen adaptada de Grandi et al. 2017 (15).

La estructura característica en la que encontramos los HERVs es en su forma de provirus. Es la versión generada por la retrotranscripción del ARN a cDNA, que termina integrada en el genoma. Esta forma tiene dos repeticiones terminales largas en los extremos (LTRs), necesarias para la integración en el genoma, y los genes gag, pro, pol y env que codifican para proteínas involucradas en la formación de nuevas partículas virales. En concreto, gag codifica para proteínas del núcleo y la matriz, pro para proteasas, pol para las enzimas transcriptasa inversa e integrasa, y finalmente, env codifica para proteínas de la envuelta (16).

A lo largo de la evolución, los HERVs se han ido multiplicando e insertando sus copias en diferentes partes del genoma. Este proceso pudo estar mediado por la maquinaria del elemento transponible LINE 1, por reinfección o por cis-transposición (figura 3) (15).

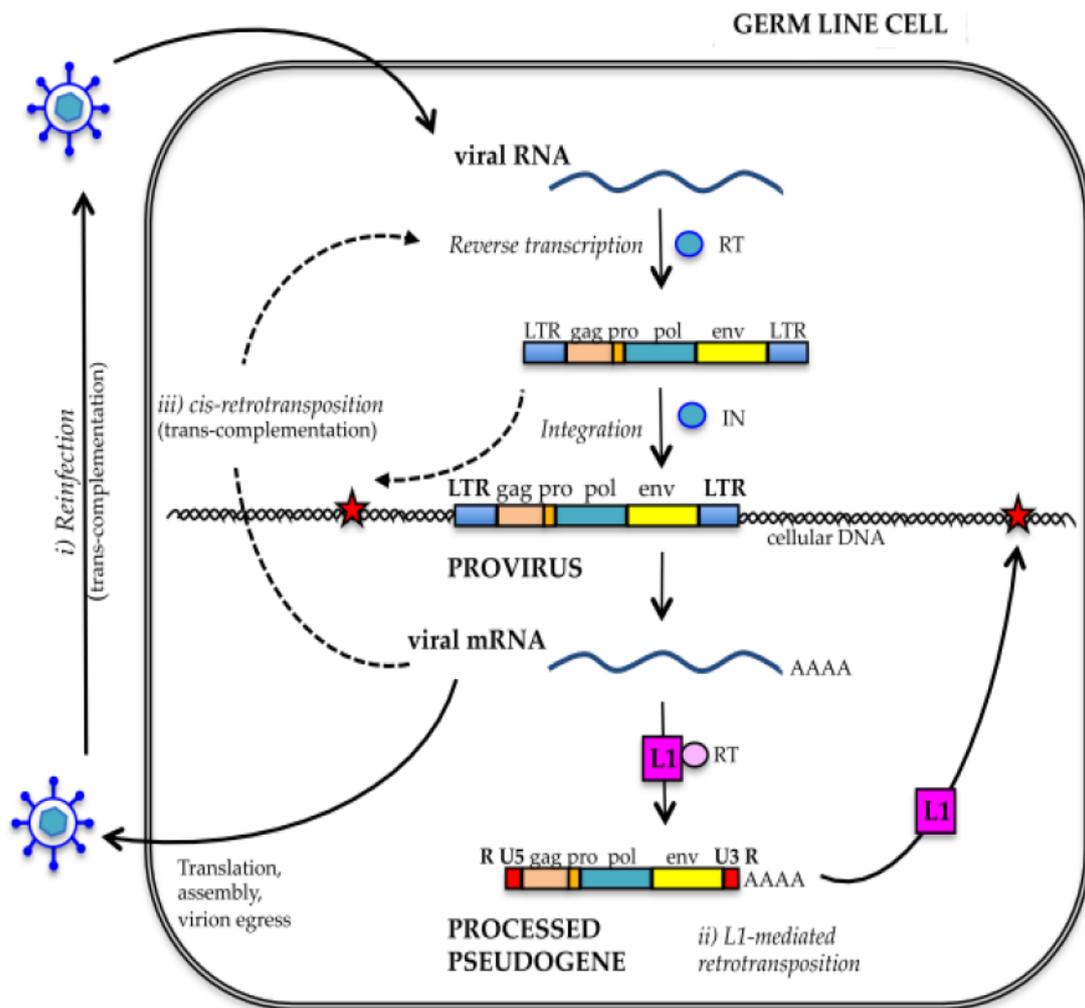


Figura 3: Mecanismo de multiplicación e inserción de los HERVs. Imagen de Grandi et al. 2017 (15).

Con el paso del tiempo, los HERVs han sufrido múltiples eventos como mutaciones, inserciones, deleciones y recombinaciones debido al largo tiempo evolutivo que estas secuencias han estado integradas en un genoma huésped (figura 4). Por ello, actualmente, la mayoría de los HERV han acabado inactivados favoreciendo su fijación en la población sin suponer un riesgo (17).

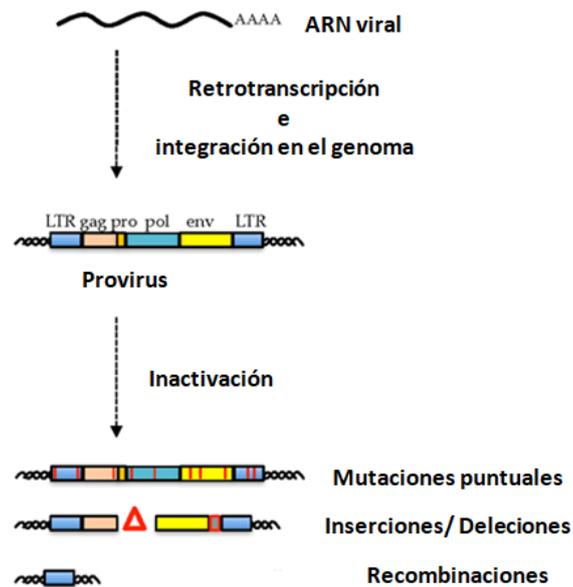


Figura 4: Evolución de retrovirus exógeno a retrovirus endógeno. Imagen adaptada de Grandi et al. 2017 (15).

Las infecciones de la línea germinal son eventos no muy frecuentes, pero a lo largo de la evolución ha debido haber varios sucesos de este tipo ya que en el genoma humano se han encontrado diversas familias de HERV (17). Los HERV se clasifican en tres grandes clases y estas, a su vez, se dividen en familias según el ARN de transferencia que se une al primer sitio de unión de la transcripción. Las tres clases descritas son: la clase I también denominada gammaretroviridae, la clase II o betaretroviridae y la clase III o spumaviridae.

El estudio de estos elementos ha demostrado su implicación en funciones fisiológicas en sus huéspedes. Este es el caso de la proteína SINCITINA-1, producto del elemento ERVWE1 perteneciente a la familia HERV-W, está involucrada en el correcto desarrollo de la placenta humana (18). Sin embargo, desde su descubrimiento, los HERVs se han asociado al desarrollo de enfermedades como la esquizofrenia, algunos tipos de cáncer o la esclerosis múltiple (19).

1.3. Regulación de los Retrovirus endógenos humanos.

La mayoría de las copias de los HERVs en el genoma son defectuosas. Sin embargo, algunos de ellos mantienen sus marcos de lectura abiertos (ORFs) permitiendo la expresión de ciertos componentes virales como es el caso de la proteína SINCITINA-1 o proteínas de la envuelta (*ENV*), implicadas en procesos patológicos (20). Generalmente, los HERVs se encuentran silenciados por mecanismos que inhiben la entrada en la célula, su replicación, su expresión o por activación del sistema inmune nativo (21). Uno de los mecanismos conocidos, asociados a la regulación de la expresión de los HERVs, es la epigenética (22).

La epigenética engloba todos aquellos procesos y elementos funcionales que regulan la expresión génica sin alterar la secuencia de ADN. El mecanismo epigenético mejor caracterizado es la metilación del ADN, que se basa en la transferencia de un grupo metilo al carbono 5 de las citosinas de los dinucleótidos CpG. Esta transferencia se puede llevar a cabo gracias a un conjunto de enzimas entre las que destacan las ADN metiltransferasas. Es conocido, que cambios en el patrón de metilación puede activar o reprimir genes (23) y esto se ha visto en el caso de los HERVs.

El silenciamiento de los HERVs también puede deberse a que estas secuencias suelen estar hipermetiladas tanto en la zona del promotor como en regiones codificantes. En el caso de la proteína SINCITINA-1, su expresión se relacionó con una hipometilación en las secuencias 5'LTR del elemento ERVWE1, miembro de la familia HERV-W, que codifica para la proteína (24). También se ha relacionado una desregulación de la metilación con el desarrollo de enfermedades autoinmunes, como es el caso de la esclerosis múltiple. Lo que se ha observado es una disminución de la metilación en copias de familias de HERVs relacionadas con la enfermedad (25). En el caso de HERV-Fc1, esta disminución en la metilación se relacionó con un aumento de expresión (57).

1.4 Esclerosis múltiple y Retrovirus endógenos humanos.

Tres familias de HERVs que se han relacionado con esclerosis múltiple son: HERV-W, HERV-K y HERV-H (26). El primer HERV que se reportó asociado a esclerosis múltiple fue en 1989 por Perrot et al. (27), este fue aislado y se denominó MSR (Sclerosis Multiple Associated Retrovirus) (figura 5) (28).



Figura 5: Partícula retroviral aislada del sobrenadante de monocitos de pacientes de EM cultivados. Imagen de Perron et al. 1991 (28).

Del estudio del MSR/V se vieron características por las cuales se clasificó en la familia de HERV-W. Todavía no se conoce su posición en el genoma pero se han identificado varios locus definidos de HERV-W cuyos niveles de expresión les hacen candidatos a representar a MSR/V (29 y Sofía Macías, tesis doctoral, 2018).

HERV-W/MSR/V fue el primer retrovirus endógeno con diferencias de expresión entre pacientes de EM e individuos sanos. Se ha encontrado a nivel de proteína unos valores muy elevados de MSR/V ENV en líquido cefalorraquídeo, lesiones cerebrales y células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de pacientes de EM. También se han relacionado estos niveles elevados en pacientes con una peor prognosis (18, 26, 31). Sin embargo, pacientes con EM sometidos a tratamientos con IFN- β o Natalizumab, muestran niveles disminuidos de MSR/V ENV (31).

Una hipótesis propuesta por la que HERV-W/MSR/V estaría relacionada con la progresión de la EM, estimulando un ambiente inflamatorio, sería la siguiente. MSR/V ENV interactuaría con el receptor TLR4 e induciría la producción de factores proinflamatorios (32). Estos factores interferirían en la diferenciación de los oligodendrocitos afectando a la expresión de la mielina (33), lo que favorecería a su vez la secreción de citoquinas proinflamatorias. Las citoquinas estimularían la liberación de la proteína MSR/V ENV que retroalimentarían el proceso.

1.5. Modelos celulares para el estudio de la EM.

Actualmente existen numerosos modelos tanto *In Vivo* como *In Vitro* para el estudio de la esclerosis múltiple. Entre los modelos *In Vitro* podemos encontrar cultivos de células del sistema nervioso central (SNC) como son las neuronas, los oligodendrocitos, la microglia o los astrocitos. También se han desarrollado co-cultivos celulares como modelo de la barrera hematoencefálica. En el caso de los modelos *In Vivo*, el más ampliamente utilizado en EM es la encefalomiелitis experimental autoinmune (EAE) en modelos animales como ratones o ratas (34).

De todos los modelos celulares existentes para la EM, no hay ninguno que sea completamente bueno, debido a que la EM es una enfermedad compleja donde intervienen muchos factores. Lo adecuado es trabajar con células del SNC y más concretamente, humanas para poder tener una visión más cercana a la realidad. El problema de los cultivos de células del SNC de humanos es por un lado, su aislamiento y por otro, su mantenimiento. Por ello, el uso de células madre embrionarias humanas (hESCs) nos podría solucionar todos los problemas con los demás modelos (35). Las células madre embrionarias humanas (hESCs) han sido obtenidas de la masa celular interna, en la etapa de blastocito, de un embrión humano. Este tipo celular presenta dos características principales. Por un lado, tienen la capacidad de proliferar indefinidamente *in vitro*, sin diferenciarse, lo que se denomina como auto-renovación. Y por otro lado, son células pluripotentes, lo que significa que son capaces de generar cualquier tipo celular perteneciente a las 3 capas embrionarias (endodermo, ectodermo y mesodermo) (36).

Las hESCs presentan varios marcadores característicos asociados a la pluripotencia. Estos marcadores pueden estar a nivel de superficie como es el caso del glucoenfingolípido SSEA-4 (*Stage-specific embryonic antigen-4*) o los proteoglicanos TRA-1-60 y TRA-1-81 (*Tumor reject antigen*). O los podemos encontrar en el interior, como los factores de transcripción entre los que destacan REX1 (*Reduced expression 1*), OCT4 (*Octamer-binding transcription factor 4*) y NANOG que juegan un papel importante en el mantenimiento de la pluripotencia (37).

Para la obtención de células diferenciadas del sistema nervioso el primer paso es la diferenciación de las hESCs a precursor neuronal. Este paso previo de inducción neuronal es imprescindible para poder obtener una fuente ilimitada de células autorrenovables. Existen numerosos protocolos descritos para la obtención de precursores neuronales entre los que destacan aquellos basados en la formación de cuerpos embrioides (EBs) y los basados en un cultivo adherente de hESCs en monocapa (38). Los EBs son agregados tridimensionales de hESCs que asemejan el desarrollo embrionario. Estos, una vez adheridos y con los medios específicos pueden generar rosetas. Las rosetas son unas estructuras que recuerdan a una sección del tubo neural y están compuestas por células con alta capacidad de diferenciación (38, 39).

Los precursores neuronales también presentan diversos marcadores y cambios morfológicos que permiten el seguimiento del proceso de diferenciación. Entre los marcadores más utilizados se encuentran los factores de transcripción SOX1 y PAX6, y la proteína de filamento intermedio NESTIN (41).

Algunos de los factores de diferenciación más utilizados en los distintos protocolos son el ácido retinoico, LDN193189, SB431542 y Noggin. Estos compuestos promueven la diferenciación de hESCs a precursor neuronal. También se suelen añadir a los cultivos el suplemento N2, que podría actuar como estimulador de la proliferación y diferenciación celular al contener insulina. Con la obtención de precursores neuronales hay una serie de factores como FGF2 (*Fibroblast Growth Factor 2*) y EFG (*Epidermal growth factor*) que se renuevan diariamente evitando la diferenciación. A estos factores se combina el suplemento B27 necesario para la proliferación y supervivencia celular (40, 41, 42).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La asociación de los retrovirus endógenos humanos con diversas patologías se estableció desde su descubrimiento. HERV-W/MSRV fue el primer retrovirus que se relacionó con la esclerosis múltiple al encontrarse aumentada su expresión en pacientes (18, 25). Los niveles de expresión de los HERVs pueden estar regulados por mecanismos epigenéticos como la metilación, hecho que ha sido demostrado para la copia HERV-Fc1 (57).

En esclerosis múltiple, se ven afectadas células del SNC por lo que se propuso estudiar los niveles de metilación de HERV-W en neuronas. Para ello, se llevó a cabo un proceso de diferenciación de hESCs a neurona, pasando por la obtención de precursores neuronales.

La hipótesis que se plantea es que existe una relación entre los niveles de metilación del HERV-W y los niveles de expresión. Se propone estudiar semejante relación en precursores neuronales tratados con agente desmetilante y en PBMCs de pacientes de EM.

Para poder estudiar las hipótesis planteadas se establecieron los siguientes objetivos:

1. Obtener precursores neuronales Lt-NES (long term neuroepithelial stem cells) y neuronas a través de la diferenciación de células madre embrionarias humanas (hESCs).
2. Caracterizar las células obtenidas tanto morfológicamente como por la expresión de marcadores específicos.
3. Analizar el grado de metilación de HERV-W/MSRV en precursores neuronales y neuronas.
4. Comparar el grado de metilación de HERV-W/MSRV entre pacientes de EM y controles.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cultivo celular de la línea ES [4].

La línea celular ES [4] es una línea de células madre embrionarias humanas (hESCs) obtenidas de la masa celular interna, en la etapa de blastocito, de un embrión humano (36). Esta línea celular fue creada por el Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona y proporcionada por el Banco Nacional de Líneas Celulares.

3.1.1. Descongelación de la línea ES [4].

Las células se encuentran criopreservadas en viales en nitrógeno líquido a -196°C . La descongelación se llevó a cabo en un baño de agua a 37°C . Tras la descongelación, la suspensión celular se transfirió a un falcon de 15 ml y se añadió medio mTeSR™1 (STEMCELL Technologies), gota a gota para minimizar el choque osmótico. Se utiliza este medio para diluir el agente criopreservante, dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich), que resulta tóxico para las células a temperatura ambiente. Se centrifugó el falcon 3 minutos a 200 G y el pellet obtenido se resuspendió en medio mTeSR™1 enriquecido con rock inhibitor (RI) (Y-27632) (Sigma-Aldrich), a una concentración de $2\ \mu\text{M}$. Este compuesto es un inhibidor selectivo de la proteína quinasa asociada a Rho (ROCK) y es utilizado por aumentar significativamente la supervivencia de las hESCs criopreservadas (44, 45). Al día siguiente el medio fue cambiado por mTeSR™1.

3.1.2. Condiciones de cultivo y mantenimiento de la línea celular.

Los pocillos donde se sembraron las células ES [4] fueron previamente tratados durante una hora a temperatura ambiente con Matrigel™ (BD Biosciences). Matrigel es el nombre comercial de una mezcla de proteínas gelatinosas secretada por Engelbreth-Holm-Swarm, células de sarcoma de ratón. Las células ES [4] crecen en medio mTeSR™1, el cual fue cambiado diariamente para favorecer un crecimiento óptimo. Para el mantenimiento de las condiciones de cultivo, 37°C y 5% de CO_2 , se usaron incubadores.

Cuando las células llegaban a una confluencia de aproximadamente el 80% se levantaron con ReLeSR™ (STEMCELL Technologies), que es un compuesto libre de enzimas que permite el pasaje de este tipo de células como agregados, lo que favorece la supervivencia celular. Para los pasajes se seleccionaron distintas diluciones dependiendo de la confluencia, el tamaño de las colonias de partida y la densidad deseada al sembrar. Normalmente, estas diluciones se movían en un rango de 1:4 - 1:8.

Para realizar el pasaje primero se lavaron las células un par de veces con PBS (Sigma-Aldrich), se añadió un volumen de ReLeSR™ (dependiente del tamaño del pocillo) y se incubó 2 minutos a 37°C. Tras estos dos minutos se retiró el volumen añadido y se incubó otros 2 minutos a 37°C. Seguidamente, se añadió medio mTeSR™1 fresco, se levantaron las células con un rascador y se disgregaron las colonias pipeteando un par de veces con una pipeta serológica de 5 ml. Finalmente, se cogió el volumen requerido para sembrar a la dilución deseada.

3.1.3. Congelación de la línea ES [4].

Para criopreservar las células se partió de una confluencia de aproximadamente el 80%. Se parte de una confluencia alta porque hay que tener en cuenta un pequeño porcentaje de muerte celular tras la descongelación. Las células se lavaron 2 veces con PBS y se trataron con ReLeSR™, una vez levantadas se pasaron a un falcon de 15 ml y se centrifugaron 3 minutos a 200 G. Se aspiró el sobrenadante y el pellet se resuspendió en un medio compuesto, el 90% por suero fetal bovino (SFB) (Thermo Fisher) y un 10% por dimetilsulfóxido (DMSO).

Las células se congelaron mediante un protocolo que sigue un método de congelación lenta, para ello estuvieron toda la noche en un contenedor de congelación basado en alcohol, que controla la velocidad de congelación, a -80°C y luego se llevaron a -196°C en nitrógeno líquido.

3.2. Generación de precursores neuronales (Lt-NES).

El protocolo de diferenciación llevado a cabo para la obtención de precursores neuronales se basó en el descrito por Koch et al. 2009 (41), con las modificaciones y optimizaciones incorporadas por el grupo de investigación (María Martínez Santolaria, TFM 2017, Máster en Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza). Este protocolo comienza con las células madre embrionarias humanas (hESCs), que se levantaron para formar cuerpos embrioides (EBs) en suspensión. Una vez estos cuerpos estuvieron adheridos, se formaron las rosetas (indicadoras de inducción neuronal) que fueron levantadas y sembradas. Tras diversos pasajes de estas rosetas se obtuvieron y expandieron las células Lt-NES (long term neuroepithelial stem cells) (figura 6).

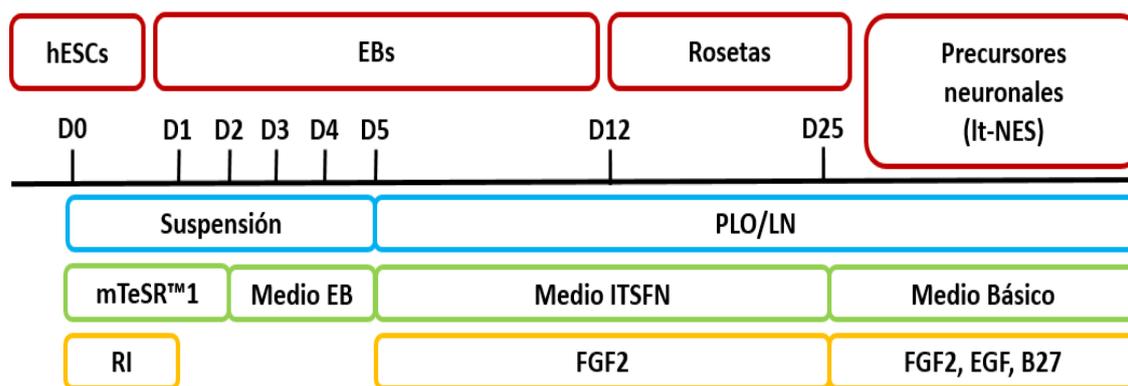


Figura 6: Esquema de diferenciación de células madre embrionarias humanas (hESCs) a células Lt-NES. Se representa en rojo y en negro los tipos de línea celular y los días en cultivo, respectivamente. En verde se indica el medio utilizado, en amarillo los suplementos y en azul el soporte del cultivo. Imagen de María Martínez Santolaria, TFM 2017, Máster en Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza.

3.2.1. Formación de cuerpo embrioides (EBs).

Para el desarrollo de este protocolo se tomó como referencia el desarrollado por Stover et al. 2011 (46). En el describen la formación de los EBs a partir de las células hESCs, las cuales se lavaron dos veces con PBS y se levantaron con acutasa (Millipore). La acutasa es una mezcla de enzimas proteolíticas y colagenolíticas que permite la disociación de las colonias de hESCs y su obtención como “single cell” (47).

Se dejó actuar la acutasa 4 minutos a 37°C y se paró la reacción diluyendo la acutasa con PBS. Las colonias se levantaron con un rascador y se disgregaron pipeteando un par de veces con una pipeta serológica de 5 ml. Lo obtenido se pasó a un falcon de 15 ml y se centrifugó a 200 G durante 3 minutos. Aspirado el sobrenadante, se resuspendió el pellet en medio mTeSR™1 enriquecido con rock inhibitor (RI) a una concentración de 2 µM, para lograr una mayor supervivencia celular (48). Las células se contaron gracias a una cámara de Neubauer y se sembraron en placas Petri con superficie no adherente, para permitir un crecimiento en suspensión y favorecer la formación de los EBs.

Al día siguiente, los cuerpos ya se habían formado y se les cambió el medio por mTeSR™1, centrifugando 5 segundos a 200 G y aspirando el sobrenadante. Al segundo día se les cambió el medio por el medio EB (tabla 1) descrito por Li et al. 2006 (49), con algunas modificaciones, y fue cambiado diariamente hasta el día 5. El medio EB se guardó a 4°C durante un máximo de una semana y antes de su uso se calentó usando el baño de agua a 37°C.

Componentes	Concentración final	Proveedor
DMEM/F12		Thermo Fisher
Glutamax	1x	Thermo Fisher
NEEA	1x	Sigma-Aldrich
2-mercaptoetanol	50 μ M	Sigma-Aldrich
Knock out serum replacement (KSR)	10%	Thermo Fisher
Penicilina y estreptomicina (P/S)	1x	Sigma-Aldrich

Tabla 1. Composición del medio EB.

3.2.2. Formación de rosetas.

Obtenidos los cuerpos embrioides (EBs), el día 5 fueron sembrados en placas de cultivo de 60 mm tratadas previamente. Este tratamiento consistió en una primera incubación de 16 horas a 37°C con Poli-L-ornitina (Sigma-Aldrich) a una concentración de 0,1 mg/ml y tras un par de lavados del pocillo con PBS, se incubó 16 horas a 37°C con Laminina (Sigma-Aldrich) a una concentración de 10 μ g/ml. Tras el tratamiento se lavó el pocillo dos veces con PBS y se sembraron los cuerpos. En esta etapa de la diferenciación se cambió el medio por el medio ITSFN (tabla 2) de inducción neuronal el cuál, se cambió diariamente desde el día 6 al 24. El medio ITSFN se suplementó con el factor de crecimiento FGF2 que favorece la correcta organización celular para la formación de rosetas. El FGF2 se encuentra a -80°C, una vez descongelado se debe guardar a 4°C y utilizar en una semana.

Componentes	Concentración final	Proveedor
DMEM/F12		Thermo Fisher
Insulina	25 μ g/ml	Sigma-Aldrich
Transferrina	100 μ g/ml	Sigma-Aldrich
Selenito de Sodio	5 ng/ml	Sigma-Aldrich
Suplementos		
FGF2	10 ng/ml	Peprtech

Tabla 2. Composición del medio ITSFN.

3.2.3. Obtención de precursores neuronales (Lt-NES).

Durante el período de tiempo en el que las células fueron tratadas con el medio ITSFN (del día 6 al día 24) se pudo observar en primer lugar, la adhesión de los cuerpos a la placa y la expansión de los mismos, y en segundo lugar, la generación de rosetas. Las rosetas aparecieron hacia el día 12 y fueron seleccionadas, mediante su observación al microscopio, para posteriormente levantarlas mecánicamente. Tras seleccionar los cuerpos que habían generado rosetas, se lavó el pocillo con DMEM/F12 y se incubó 1 hora a 37°C con el reactivo STEMdiff™ Neural Rosette Selection (STEMCELL Technologies). Tras la incubación se descartó el reactivo y se añadió un volumen de DMEM/F12 que, con ayuda de una micropipeta P1000, se expulsó firmemente sobre las rosetas generadas. Lo levantado se recogió en un falcon de 15 ml y si se seguían observando rosetas se repetía el proceso de añadir DMEM/F12 y pipetear.

El falcon se centrifugó 3 minutos a 200 G y el pellet se resuspendió en un nuevo medio denominado medio básico o de expansión (tabla 3). Este medio va suplementado con distintos factores de crecimiento que evitan la diferenciación y se añaden frescos cada día.

Componentes	Concentración final	Proveedor
DMEM/F12		Thermo Fisher
Glutamax	1x	Thermo Fisher
Glucosa	1´6 mg/ml	Sigma-Aldrich
Suplemento N₂	1x	Thermo Fisher
Penicilina y estreptomicina (P/S)	1x	Sigma-Aldrich
Suplementos		
FGF2	10 ng/ml	Peprtech
EGF	10 ng/ml	STEMCELL Technologies
B27	1x	Thermo Fisher

Tabla 3. Composición del medio básico o de expansión.

Las rosetas resuspendidas en el nuevo medio se sembraron a alta densidad en placas tratadas previamente con Poli-L-ornitina y Laminina, siguiendo el mismo tratamiento descrito anteriormente. Por problemas en la expansión de las células Lt-NES se cambió el protocolo a una incubación de 1 hora a 37°C con Poli-L-ornitina a una concentración de 0´05 mg/ml y otra hora de incubación a 37°C con laminina, a una concentración de 10 µg/ml.

El medio se cambió diariamente y una vez confluentes las células, se pasaron también densas eligiendo la dilución en función de la confluencia de partida. Las células se pasaron con acutasa, limpiando previamente el pocillo con DMEM/F12 e incubándolas 5 minutos a 37°C con el compuesto. Tras la incubación se añadió DMEM/F12 para diluir la acutasa y con una micropipeta P1000 se expulsó el líquido sobre el pocillo para levantar las células que quedaran pegadas tras el tratamiento. Estas fueron pasadas a un falcon que se centrifugó durante 3 minutos a 200 G y se resuspendió el pellet obtenido en medio básico o de expansión.

Para su estudio, tras levantar las células con acutasa y obtener un pellet de las mismas, se homogeneizaron (pasando la mezcla unas 10 veces por una aguja de 25 gauges) en un volumen del reactivo comercial TRIzol®. Este compuesto conserva los ácidos nucleicos y en particular, mantiene la integridad del ARN durante la homogeneización tisular. Una vez homogeneizadas las muestras se guardaron a -80°C.

3.2.4. Congelación de los precursores neuronales.

Para la criopreservación de los precursores neuronales o células Lt-NES obtenidas, se levantaron con un tratamiento de acutasa de 5 minutos a 37°C y se centrifugaron 3 minutos a 200 G. El pellet obtenido se resuspendió en un medio compuesto el 90% por suero fetal bovino (SFB) y un 10% por dimetilsulfóxido (DMSO). Los viales estuvieron toda la noche a -80°C y posteriormente, fueron llevados al nitrógeno líquido (-196°C).

3.2.5. Descongelación de los precursores neuronales.

Los viales criopreservados se descongelaron en un baño de agua a 37°C. Una vez descongelados se pasó su contenido a un falcon de 15 ml y se añadió gota a gota DMEM/F12. Se centrifugó el falcon 3 minutos a 200 G y el pellet se resuspendió en medio básico o de expansión. Tras tratar los pocillos seleccionados con Poli-L-ornitina y Lamina, se sembraron las células.

3.3. Generación de precursores neuronales (NPCs).

Un protocolo alternativo para la obtención de precursores neuronales (NPCs) fue descrito por García-León et al. 2018 (42). Este protocolo de diferenciación toma como células de partida las células madre embrionarias humanas (hESCs) y tras 10 días de cultivo con diferentes medios obtuvimos los precursores. En el siguiente esquema se resume el protocolo de diferenciación (Figura 7):

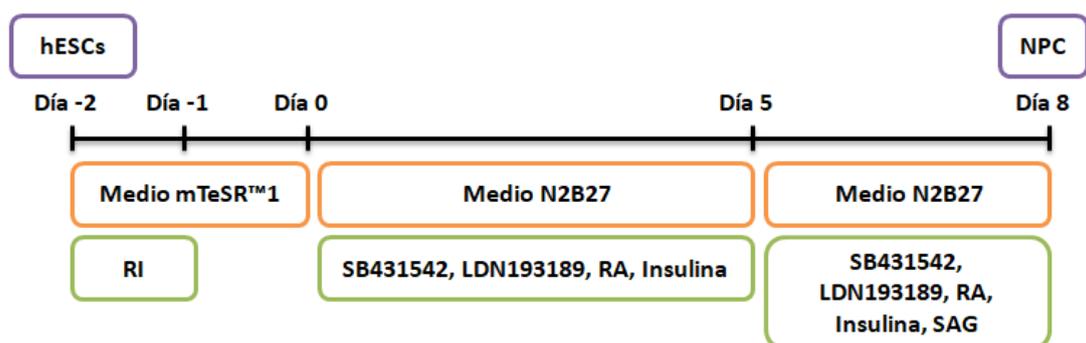


Figura 7: Esquema de diferenciación de células madre embrionarias humanas (hESCs) a NPCs: Se representa en morado y en negro los tipos de línea celular y los días en cultivo, respectivamente. En naranja se representan los medios utilizados de los que se detallará su composición (tabla 4 y 5), y en verde, los suplementos utilizados.

Se levantaron con acutasa cultivos de la línea ES [4] siguiendo un tratamiento de 4 minutos a 37°C y se paró la reacción con PBS. La suspensión celular se pasó a un falcon y se centrifugó 3 minutos a 200 G. El pellet se resuspendió en medio mTeSR™1 enriquecido con rock inhibitor a una concentración de 2 µM y seguidamente, se hizo un conteo celular con la cámara de Neubauer. Se sembraron 200.000 células por pocillo (placa de 6 pocillos) habiendo tratado previamente estos pocillos durante una hora a temperatura ambiente con Matrigel™.

Esta primera siembra y única, ya que no se levantaron las células durante el protocolo, corresponde al día -2 del esquema. Al día siguiente (día -1), se cambió el medio por solo medio mTeSR™1 y en el día 0 del protocolo se cambió el medio por el medio N2B27, que se cambió y se añadieron todos los factores frescos diariamente (tabla 4).

Componentes	Concentración final	Proveedor
DMEM/F12		Thermo Fisher
Suplemento N₂	1x	Thermo Fisher
Suplemento B27	1x	Thermo Fisher
Glutamax	1x	Thermo Fisher
NEEA	1x	Sigma-Aldrich
2-mercaptoetanol	50 µM	Sigma-Aldrich
Penicilina y estreptomicina (P/S)	1x	Sigma-Aldrich
Suplementos		
SB431542	10 µM	Axonmedchem
LDN193189	1 µM	Axonmedchem
Ácido retinoico (RA)	100 nM	Sigma-Aldrich
Insulina	25 µg/ml	Sigma-Aldrich

Tabla 4: Composición del medio N2B27. Se detallan los suplementos añadidos frescos diariamente.

En el día 5 del protocolo se continuó con el medio N2B27 pero se añadió, a parte de los demás factores, el factor SAG hasta el día 8 del protocolo (tabla 5). Ese día se obtuvieron los NPCs.

Componentes	Concentración final	Proveedor
DMEM/F12		Thermo Fisher
Suplemento N₂	1x	Thermo Fisher
Suplemento B27	1x	Thermo Fisher
Glutamax	1x	Thermo Fisher
NEEA	1x	Sigma-Aldrich
2-mercaptoetanol	50 µM	Sigma-Aldrich
Penicilina y estreptomicina (P/S)	1x	Sigma-Aldrich
Suplementos		
SB431542	10 µM	Axonmedchem
LDN193189	1 µM	Axonmedchem
Ácido retinoico (RA)	100 nM	Sigma-Aldrich
Insulina	25 µg/ml	Sigma-Aldrich
SAG	1 µM	STEMCELL Technologies

Tabla 5: Composición del medio N2B27. Se detallan los suplementos añadidos frescos diariamente.

3.3.1. Tratamiento de los NPCs con 5-Aza-2-Deocitidina.

Los precursores neuronales se trataron con el compuesto 5-Aza-2'-Deoxicitidina (Sigma-Aldrich) que es un inhibidor de la actividad de la enzima ADN metiltransferasa. Esta inhibición da como resultado una desmetilación del ADN que puede regular la expresión génica con la “apertura” de la cromatina (50). El compuesto se añadía diariamente con el medio descrito en la tabla 5, partiendo de una solución madre a una concentración de 2 mM. Se trataron las células a diferentes concentraciones y distintos tiempos (figura 8).

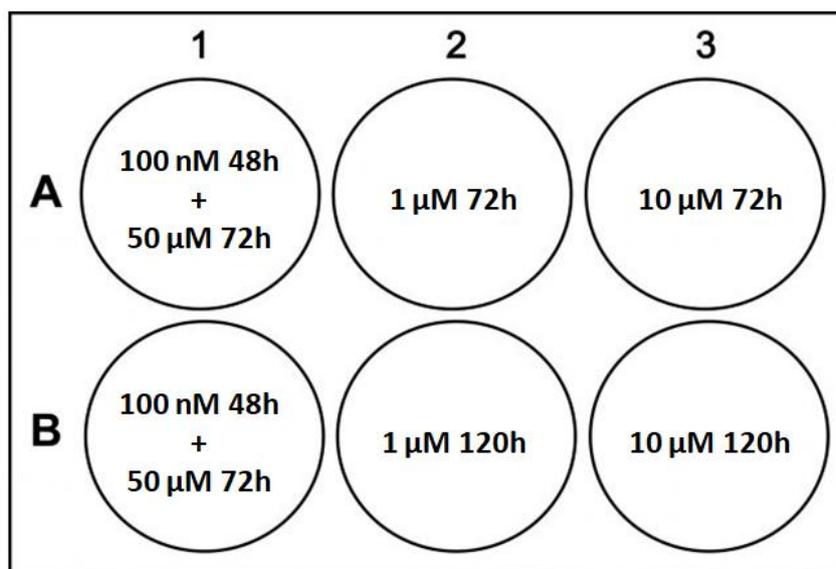


Figura 8: Representación del tratamiento con 5-Aza-2-Deocitidina. Se realizó en una placa de 6 pocillos y se utilizó una placa de 35 mm como control (se añadió el medio de la tabla 5 sin 5-Aza-2-Deo). En cada pocillo se muestra la concentración y el tiempo al que fueron sometidas las células al compuesto. En el caso de los pocillos **1A** y **1B**, tras la primera incubación de 48 horas a una baja concentración, se aumentó la concentración del compuesto.

3.4. Ensayos de expresión génica.

3.4.1. Extracción de ARN.

El protocolo para la extracción de ARN fue puesto a punto previamente por el grupo de investigación y se basa en una extracción con fenol-cloroformo seguida de una precipitación con isopropanol. El material usado para el siguiente protocolo era libre de RNAsas.

Se comenzó añadiendo a la mezcla de suspensión celular con TRIzol® un volumen de cloroformo (Sigma-Aldrich) y, tras agitar y centrifugar, se obtuvieron tres fases. En la fase superior acuosa se encontraba separado el ARN, en la interfase se localizaba el ADN genómico y en la fase inferior los restos celulares. Para precipitar el ARN obtenido se separó la fase superior acuosa y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente con 0,6 V de isopropanol (MP Biomedicals) y 1,5 μ l de glucógeno, que actúa como co-precipitante. Tras la incubación y una centrifugación, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con etanol al 75%. Posteriormente, se resuspendió en agua Mili-Q libre de RNAsas y se dejó reposar 5 minutos.

Para eliminar los posibles restos de ADN genómico, se trató el RNA con la enzima RQ1 RNase Free DNase (Promega) durante 15 minutos a 37°C. Tras la incubación, se procedió al tratamiento con fenol que desnaturalizó las posibles proteínas contaminantes. Una centrifugación permitió obtener los ácidos nucleicos en la fase superior acuosa. La adición de cloroformo a esta fase superior separó los posibles contaminantes, localizados en la fase orgánica, del ARN que se encontraba en la fase acuosa. Con el fin de extraer todo el ARN que pudiera haberse quedado en la fase orgánica, se añadió agua Mili-Q al tubo y se centrifugó. Toda la fase superior acuosa obtenida se incubó 10 minutos a temperatura ambiente con 0,1V de acetato de sodio (NaAc), 3V de etanol al 100% y 1,5 µl de glucógeno para precipitar el ARN. Tras centrifugar y lavar el pellet con etanol al 75%, se resuspendió en agua Mili-Q sin RNasas. Se determinó la concentración del ARN purificado con un espectrofotómetro Nanodrop ND-2000 (Thermo Scientific).

3.4.2. Obtención de cDNA.

Obtenido el ARN se llevó a cabo su transcripción reversa o retrotranscripción para la obtención del ADN complementario (cDNA). Se partió de 500 ng de ARN y se siguió el protocolo marcado por el fabricante del kit utilizado *PrimeScript*TM RT reagent RR037A (Takara). Se utilizó como cebador Random hexamer que consisten en oligonucleótidos de 6 bases sintetizados al azar que coinciden aleatoriamente con secuencias complementarias del ARN usado como molde. Se incubó toda la mezcla durante 15 minutos a 37°C y seguidamente, se incubó 5 segundos a 85°C para la inactivación de la enzima mediante un tratamiento con calor. El producto obtenido se mantuvo a 4°C, si su uso era inmediato, o se almacenó a -80°C para un uso posterior.

3.4.3. Expresión génica por PCR estándar.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que permite amplificar un número exponencial de veces una secuencia definida de ADN, a través de una reacción mediada por la enzima ADN polimerasa. Más concretamente, la enzima utilizada fue la Taq polimerasa (Sigma-Aldrich), extraída de la bacteria *Thermophilus aquaticus*, altamente termoestable.

La reacción tuvo lugar en un volumen final de 50 µl donde se encontraban los reactivos utilizados (tabla 6) y el cDNA obtenido con anterioridad (2 µl). Las condiciones de la reacción fueron 2 minutos a 98°C, 35 ciclos de 3 etapas de 1 minuto cada una de 94°C, 60°C y 72°C, y 5 minutos a 72°C. Estas condiciones se programaron en un termociclador (VeritiTM).

Reactivos	Concentración final	Proveedor
Tampón + Mg ²⁺	1x	Sigma-Aldrich
dNTPs	0´2 µM	
Cebadores	0´4 µM	
Taq Polimerasa	0´5 U/ µl	Sigma-Aldrich
Agua Mili-Q		

Tabla 6. Reactivos utilizados en la PCR. Los cebadores utilizados y sus secuencias se detallan en el Anexo 1.

Tras la amplificación, los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa (Condalab) al 1´5% y se añadió como marcador de peso molecular GeneRuler 100 pb DNA ladder (Thermo Scientific). Para su visualización se utilizó como intercalante Gel Red (Biotium) a una dilución 1:10.000 y un transiluminador (BioRad).

3.4.4. Expresión génica cuantitativa.

La PCR a tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR) es una variante de la PCR en la cual, se puede cuantificar el producto de la amplificación gracias a la fluorescencia. La fluorescencia es emitida por un fluoróforo añadido a la reacción, en este caso fue utilizado SYBR® Green que es un agente intercalante. Por tanto, durante la reacción se va midiendo la fluorescencia y cuando esta llega a un umbral de detección establecido, se determinan el número de ciclos que ha tardado la muestra en llegar a dicho umbral (Ct).

Un menor número de ciclos obtenidos se relacionaría con una mayor concentración de material de partida. De este modo, se podría calcular la concentración relativa del material genético utilizado, en este caso cDNA, con respecto a un control y por ende, de la expresión del ARN mensajero (mRNA).

Para llevar a cabo la reacción se utilizó el Kit SYBR® Premix Ex Taq II (Takara). Se utilizó 1 µl de cDNA, obtenido anteriormente, a la dilución optimizada para cada pareja de cebadores, así como se añadió un volumen de agua Mili-Q o Cloruro de Magnesio (MgCl₂) también dependiente de los mismos. La mezcla contenía los reactivos representados en la tabla 7 y se llevó a cabo la reacción en un volumen final de 15 µl. Los análisis se realizaron por triplicado y se incluyeron controles negativos con agua Mili-Q.

Reactivos	Concentración final
Super mix SYBR	1x
ROX	1x
Cebadores	200 nM
MgCl ₂	1 mM
Agua Mili-Q	

Tabla 7. Reactivos utilizados en la qPCR. Los cebadores utilizados y sus secuencias se detallan en el Anexo 2.

Las condiciones de la reacción desarrolladas en la tabla 8 se programaron en un termociclador ViiATM 7 (Applied Biosystems) y los datos obtenidos se procesaron mediante el método $\Delta\Delta Ct$. Con este método se normalizaron los datos, primero con un gen de referencia o House Keeping donde se utilizó el gen gliceraldehído-3-fosfatodeshidrogenasa (GAPDH) y en segundo lugar, se normalizaron frente a un control que fueron las células madre embrionarias humanas (hESCs).

Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3 (40 ciclos)		Etapa 4		
50°C	95°C	95°C	60°C	95°C	60°C	95°C
2 min	10 min	15 seg	1 min	15 seg	20 seg	15 seg

Tabla 8. Condiciones programadas para la qPCR.

3.5. Ensayos de metilación.

3.5.1. Extracción de ADN genómico.

Para la extracción de ADN genómico (gDNA) se levantaron las células con acutasa y al pellet obtenido se le añadió 1 ml de tampón de lisis FG2 (30mM de Tris-HCl a pH 8.5, 40% (m/v) de CH₅N₃.HCl y 30mM de EDTA a pH 8). Tras resuspender bien el pellet, se añadieron 10 µl de proteasa (QIAGEN). Esta mezcla se incubó durante toda la noche a 65°C en un baño termostatzado (GRANT) y después de la incubación, las muestras se guardaron a 4°C o se siguió con el protocolo de extracción.

Siguiendo el protocolo, se le adicionó a la mezcla obtenida 2-propanol para que el ADN formara un precipitado. Tras vortear y centrifugar 5 minutos a 13.000 rpm, se aspiró el sobrenadante y se lavó el pellet obtenido con etanol al 70%. Se volvió a vortear y tras centrifugar 5 minutos a 13.000 rpm se dejó secar el pellet, aproximadamente 1 minuto.

El pellet se resuspendió en tampón TE y se incubó 1 hora a 65°C y 900 rpm en un thermomixer (Eppendorf) para facilitar la solubilización. Una vez homogeneizadas las muestras se centrifugaron 2 minutos a 13.000 rpm para eliminar algún posible resto celular y se guardó el sobrenadante. Se determinó la concentración y la calidad del ADN genómico extraído con un espectrofotómetro Nanodrop ND-2000 (Thermo Scientific). Finalmente, el gDNA se conservó a 4°C.

El gDNA de PBMCs de sangre periférica se extrajo según el protocolo anterior. Estas muestras clínicas se obtuvieron previo firma de un Consentimiento Informado en el contexto de un estudio más amplio llamado “la reactivación de los Retrovirus Endógenos Humanos (HERV) en esclerosis múltiple: control epigenético y el potencial diagnóstico”. Dicho estudio fue evaluado y aprobado por CEICA en 2014 (expediente PI14/0021).

3.5.2. Conversión con bisulfito.

El tratamiento de ADN genómico con bisulfito tiene como objetivo convertir las citosinas no metiladas de una secuencia, en uracilos. Es un paso imprescindible para después conocer los dinucleótidos CpG metilados en la secuencia mediante secuenciación. Para esta conversión se partió de 500 ng de gDNA y se utilizó el kit comercial EZ DNA Methylation (Zymo Research), siguiendo el protocolo marcado por el fabricante. El DNA convertido tras el tratamiento se eluyó en tampón TE y se guardó a -20°C hasta su uso.

3.5.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Antes de llevar a pirosecuenciar las muestras, se amplificó la región de interés mediante dos PCR consecutivas. Con la primera PCR se consiguió amplificar una región amplia donde se encontraba la región de interés, y con la segunda PCR se preparó el material a secuenciar. Esta preparación consistió por una parte, en la amplificación de una región más específica partiendo del producto de la primera PCR y por otra parte, biotinilando las secuencias con cebadores biotinilados, favoreciendo de este modo el proceso de secuenciación.

La enzima utilizada en las PCRs fue la Taq polimerasa (Sigma-Aldrich) y en ambos casos, tanto la temperatura de hibridación de los cebadores como la concentración de magnesio estaban optimizadas (Sofía Macías, comunicación personal). El volumen final de las PCRs fue de 50 µl y la mezcla de reactivos representados en la tabla 9, también fue la misma.

Reactivos	Concentración final
Tampón con 1´5 mM de MgCl ₂	1x
Mg ²⁺	2´5 mM
Cebadores	400 nM
dNTPs	200 µM
Taq polimerasa	0´5 U
Agua Mili-Q	

Tabla 9. Reactivos utilizados en ambas PCRs. Los cebadores utilizados y sus secuencias se detallan en el Anexo 3.

Las diferencias entre las dos PCRs consecutivas fueron la cantidad de material genético de partida, las condiciones de la reacción y los cebadores. En la primera PCR se añadieron 4 µl de ADN convertido previamente, los cuales se hirvieron durante 2 minutos a 100°C en un termobloque (GRANT) y se dejaron un tiempo en hielo antes de añadirlos a la mezcla. Las condiciones de la reacción que se programaron en el termociclador fueron 35 ciclos de 3 etapas de 1 minuto cada una de 94°C, 55°C y 72°C, y 10 minutos a 72°C. En el caso de la segunda PCR, se añadió a la mezcla de reacción 1 µl de producto de la primera PCR y las condiciones de reacción programadas fueron 2 minutos a 98°C, 35 ciclos de 3 etapas de 30 segundos cada una de 94°C, 55°C y 72°C, y 10 minutos a 72°C. Tras la segunda PCR se visualizaron los productos amplificados en un gel de agarosa al 1´5%, con Gel Red (1:10.000) como intercalante y un transiluminador (BioRad).

3.5.4. Pirosecuenciación.

La pirosecuenciación es un tipo de secuenciación que se basa en la detección de una señal luminosa generada por una reacción quimioluminiscente. Esta reacción usa como sustrato el pirofosfato que se libera como resultado de la incorporación de un nucleótido. El pirofosfato es convertido a ATP gracias a la ATP sulfuroilasa, que luego en conjunto con la enzima luciferasa realizan la conversión de la luciferina, lo cual genera luz. La señal luminosa registrada es proporcional a la altura del pico obtenido en el pirograma, que a su vez está relacionada con el número de nucleótidos incorporados.

Esta técnica fue realizada por el servicio de genómica del CIBA y se utilizó el programa PyroQ-CpG 1.09 (QIAGEN). Gracias a la previa biotinylación de los amplicones preparados se purificó la cadena complementaria con bolas de sefarosa unidas a estreptavidina, esto hizo posible la secuenciación dándonos la secuencia de la hebra molde.

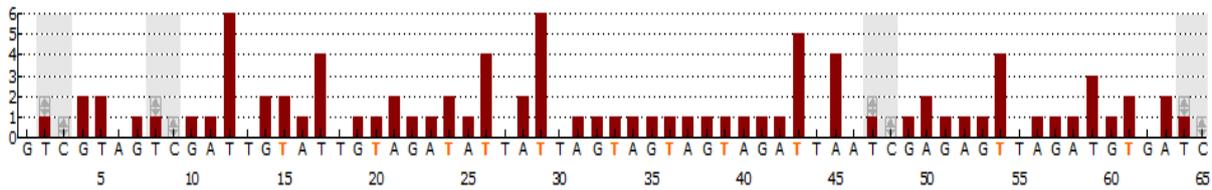


Figura 9: Histograma obtenido con el programa PyroQ-CpG 1.09, poniendo la secuencia de HERV-W Chr9. Se observa la secuencia de nucleótidos en orden, simulada por el programa. La altura de las columnas está relacionada con el número de nucleótidos.

El programa utilizado nos da previamente el histograma con la secuencia de interés que luego se compara con los pirogramas obtenidos.

3.6. Ensayos de citometría de flujo.

La citometría de flujo se utilizó para la caracterización celular, tanto de las células madre embrionarias humanas (hESCs) como los precursores neuronales (Lt-NES). Se estudiaron diversos marcadores de pluripotencia y de precursor neuronal. Para ellos se levantaron las células con acutasa con un tratamiento de 4 minutos a 37°C y tras centrifuga durante 3 minutos a 200 G se obtuvo un pellet que se resuspendió en PBS. Se realizó un conteo celular con la cámara de Neubauer y se repartieron 200.000 células por tubo es decir, por condición. En este punto el protocolo se diferenció según el tipo de marcaje utilizado: marcaje extracelular o marcaje intracelular.

En el caso del marcaje intracelular, el primer paso tras repartir las células fue tratarlas con el reactivo Cytox (Thermo Fisher), proporcionado por el servicio de citometría de flujo y separación celular del CIBA, que permite distinguir entre células vivas y muertas. Este mismo reactivo, en el caso del marcaje extracelular, se añadió al final del protocolo. Tras marcar con Cytox las células en el marcaje intracelular, se fijaron con una solución de formaldehído al 4% y se lavaron posteriormente con la solución de bloqueo (PBS con suero fetal bovino (FBS) al 5%) para eliminar posibles restos de formaldehído que resulta tóxico para las células.

Tanto el anticuerpo primario como el secundario se prepararon con la solución de bloqueo aunque en el caso del marcaje intracelular, esta solución contenía un 0´1% de saponina para facilitar la permeabilización del anticuerpo. El anticuerpo primario se incubó durante 1 hora a 4°C en oscuridad y tras la incubación se lavaron las células con la solución de bloqueo para eliminar anticuerpo sobrante.

Después se incubó el anticuerpo secundario durante 30 minutos a 4°C en oscuridad y también se lavaron las células tras esta incubación. El anticuerpo secundario utilizado fue Alexa-Fluor 488 (verde) Goat Anti-mouse (DSHB), a una dilución 1:50 y los anticuerpos primarios utilizados se enumeran a continuación (tabla 10):

Anticuerpo	Especie	Tipo de marcaje	Concentración final	Proveedor
α SSEA-4	Ratón	Extracelular	0'5 μ g/ml (1:38)	DSHB
α PAX6	Ratón	Intracelular	2 μ g/ml (1:8'75)	DSHB
α NESTIN	Ratón	Intracelular	2 μ g/ml (1:4'5)	DSHB

Tabla 10. Anticuerpos primarios utilizados en el ensayo de citometría de flujo.

Como control negativo de autofluorescencia celular, se analizaron las células sin marcajes de anticuerpos, solo tratadas con el reactivo Cyttox. También se introdujo otra condición como control de especificidad del anticuerpo secundario, en este caso las células solo eran marcadas por este anticuerpo y el reactivo Cyttox.

Las muestras marcadas se dieron a la unidad de citometría y separación celular del CIBA y estos nos proporcionaron los datos. Se utilizó un citómetro FACSAria (BD BioSciences) y los datos se analizaron con el programa weasel (version 2.6.1).

4. RESULTADOS

4.1. Obtención de precursores neuronales (Lt-NES).

Para poder estudiar la metilación de las copias HERV-W/MSRV relacionadas con la esclerosis múltiple, se quiso utilizar como modelo celular neuronas. Para ello, se comenzó generando precursores neuronales o células Lt-NES (long term neuroepithelial stem cells) siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4.2 (Materiales y métodos). Mediante este protocolo, a partir de células madre embrionarias humanas (hESCs) (Figura 10) se formaron los EBs, los cuales generaron rosetas permitiendo la obtención de las células Lt-NES.

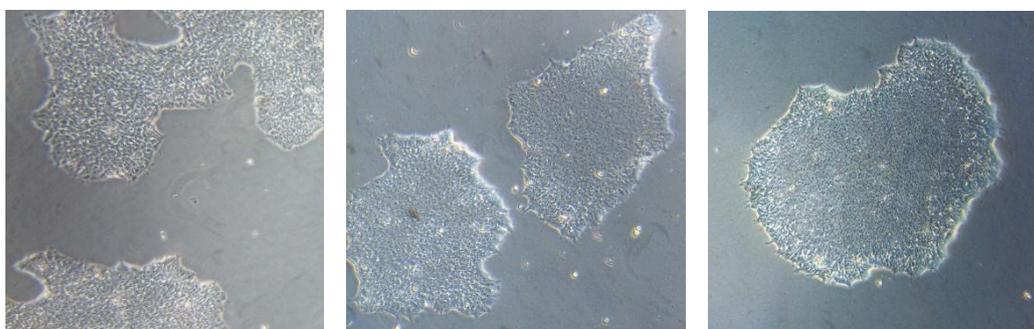


Figura 10: Colonias de células madre embrionarias humanas (hESCs). Vistas al microscopio con el objetivo x10. Los puntos blancos que se observan fuera de las colonias es muerte celular. Las colonias de células madre embrionarias humanas (hESCs) de la línea ES [4] cultivadas, tenían una morfología igual a la esperada, con fuertes contornos así como con una disposición celular compacta y en monocapa.

4.1.1. Formación de EBs.

Para la formación de EBs se levantaron las hESCs con acutasa y tras un recuento celular, se sembraron unos tres millones de células por placa Petri. Como se observa en la Figura 11, las células se encontraban disociadas en el momento de la siembra por lo que se enriqueció el medio mTeSR™1 con RI para lograr una mayor supervivencia celular (48). Al segundo día de sembrar las células, se cambió el medio por el medio EB y ya se podían distinguir los cuerpos embrioides formados en suspensión. Tenían los bordes bien definidos y fueron aumentando de tamaño y densidad hasta el día 5, el día que fueron plaqueados (Figura 11).



Figura 11: Formación de cuerpos embrioides (EBs). Visto al microscopio con el objetivo x10. **Día 0:** Células hESCs disociadas, recién sembradas, tras levantarlas con acutasa. **Día 2:** EBs formados y bien definidos. **Día 5:** Aumento de tamaño y complejidad de los EBs.

4.1.2. Formación y selección de rosetas.

En el día 5 del proceso de diferenciación, los EBs formados se sembraron en placas de cultivo y a las 24 horas de plaquear los EBs ya se encontraban la mayoría adheridos a la placa. Se cambió el medio como en el caso del medio EB, centrifugando, para evitar perder aquellos que no se habían adherido. Pero a las 48 horas, es decir, en el día 7 del proceso de diferenciación, ya estaban todos los cuerpos adheridos y se podía apreciar una monocapa de células que salía de ellos (figura 12). Con el paso de los días, los EBs se iban expandiendo más y sobre el día 10 del proceso de diferenciación, se comenzaron a visualizar las estructuras denominadas rosetas. Estas se veían dentro de los cuerpos adheridos y estaban compuestas por células alargadas dispuestas de forma radial en torno a un centro (figura 12).

Las rosetas se seleccionaron y levantaron sobre el día 12 de la diferenciación. Aquellos EBs que aún no habían generado rosetas se dejaron en la placa y se les siguió cambiando el medio hasta la identificación de rosetas o el día 25 del proceso de diferenciación, dónde se cambiaba el medio por el medio de expansión o medio básico.

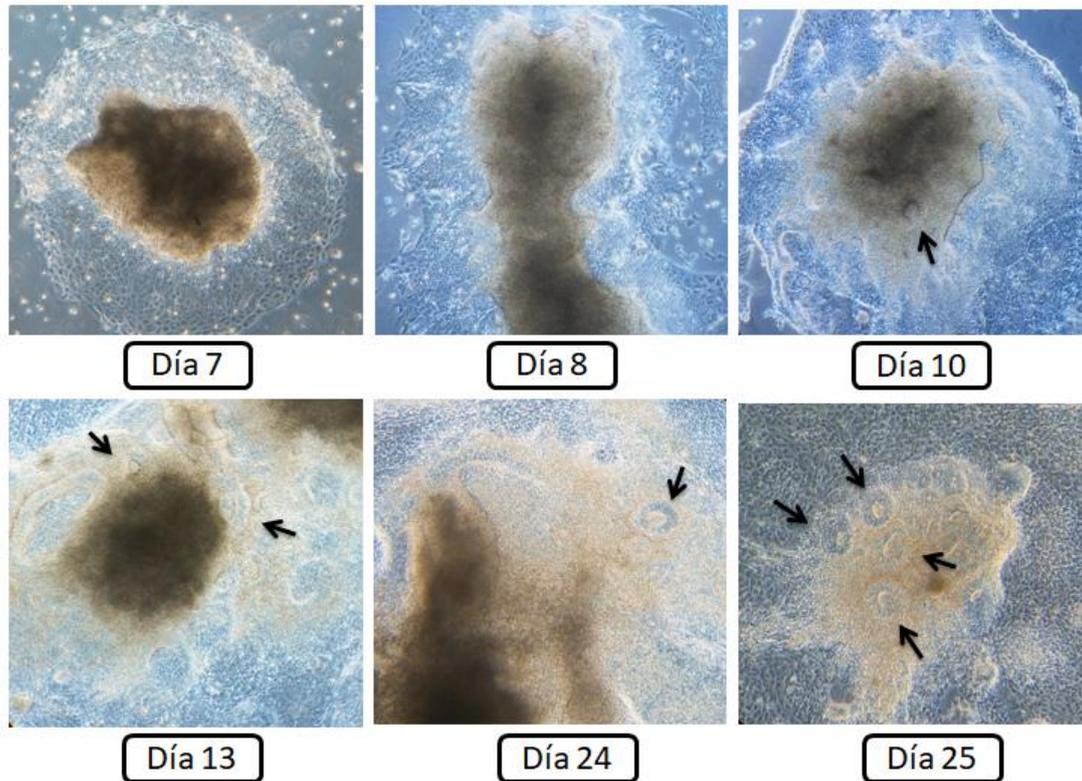


Figura 12: Formación de rosetas. Las hESCs fueron disociadas, sembradas para la formación de EBs y plaquedas el día 5. Visto al microscopio con el objetivo x10. Los días representados se contaron desde el primer día del proceso de diferenciación, con el levantamiento de las hESCs. Las flechas en las fotos señalan las rosetas generadas. **Día 7 y 8:** EBs adheridos y generación de una monocapa celular alrededor de los mismos. **Día 10 y 13:** Generación de las primeras rosetas. **Día 24 y 25:** Rosetas generadas en los últimos días con el medio ITSFN y FGF2.

Como se puede apreciar en la figura 12, no todos los EBs generaban rosetas en los mismos días de la diferenciación. Unos comenzaron a generar hacia el día 10 mientras otros los generaban sobre el día 25. Esto podría deberse al tamaño de los EBs formados y la densidad de los mismos. Se observó que EBs de tamaño pequeño y poca densidad no llegaban a generar rosetas, volviendo a formar una colonia celular similar a una de hESCs (figura 13).



Figura 13: EBs plaqueados. Las flechas señalan los EBs pequeños con poca densidad que volvieron a formar colonias sin generar rosetas. Visto al microscopio con el objetivo x10.

4.1.3. Obtención de las células Lt-NES.

Una vez levantadas las rosetas, se sembraron en placas tratadas previamente con Poli-L-ornitina y Laminina. Se utilizó el medio de expansión o medio básico suplementado con FGF2, EGF y B27 (Materiales y métodos). La siembra se realizó a alta densidad y la placa sembrada no se veía homogénea, se observaban agregados celulares (figura 14). La presencia de estos agregados se debe al levantamiento de otros tipos celulares junto con las rosetas, pero fueron desapareciendo con los sucesivos pasajes.

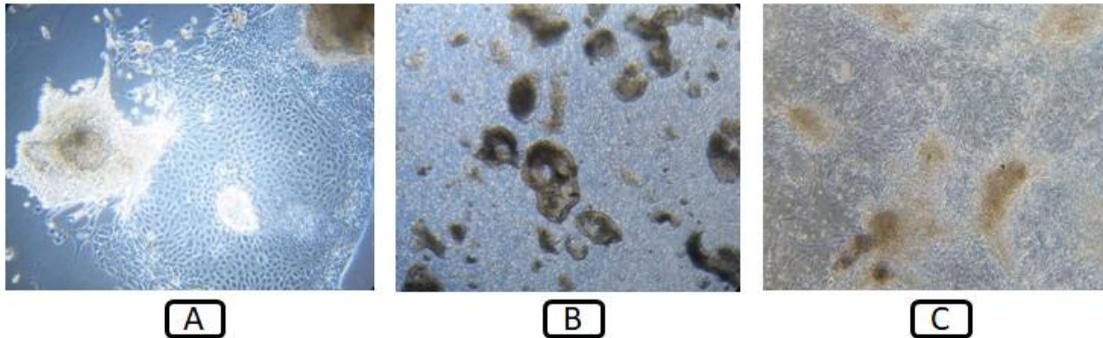


Figura 14: Levantamiento de rosetas y su posterior siembra. Visto al microscopio con el objetivo x10. **A:** Restos de células en la placa tras el levantamiento de las rosetas. **B:** Rosetas levantadas, recién sembradas en la placa tratada con Poli-L-ornitina y Laminina. **C:** Cultivo de rosetas sembradas, cultivo heterogéneo con agregados celulares.

Las células obtenidas se comparaban morfológicamente con las generadas por Koch et al. 2009 (41) representadas en la figura 15. Durante el proceso de expansión, las células obtenidas tenían morfología parecida pero no idéntica entre las distintas tandas (figura 15). Por ejemplo, la morfología en las células E y F de la figura 15, se ve mucho más alargada que las demás. Esto podría deberse a que están más diferenciadas por haber estado mayor tiempo en cultivo, como es el caso de las células de la foto F las cuales estuvieron hasta el día 25 con el medio ITSFN y FGF2.

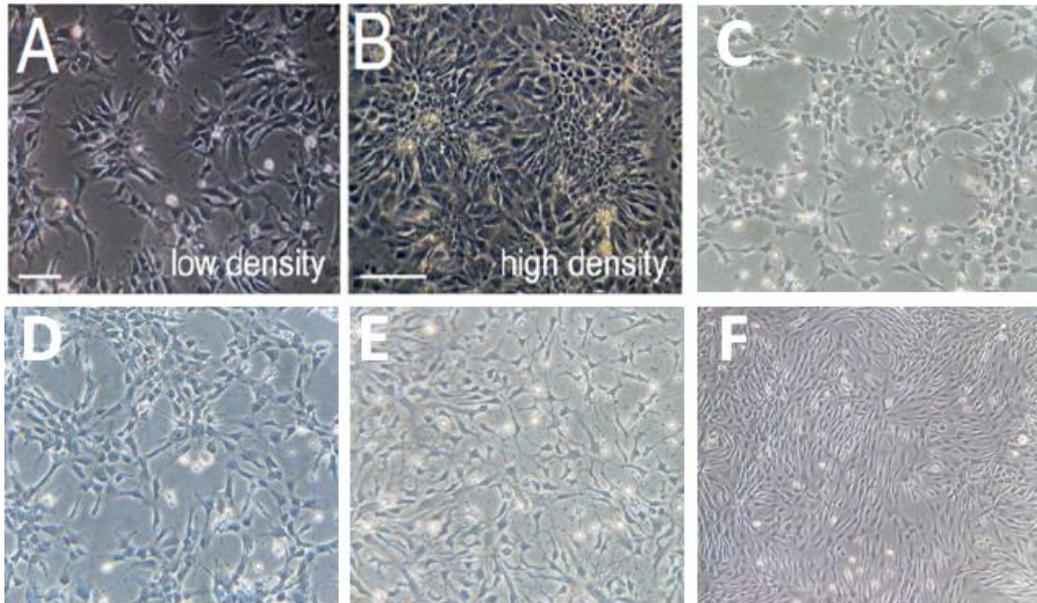
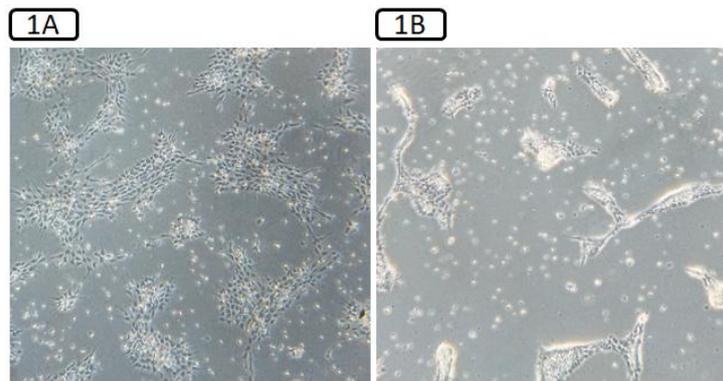


Figura 15: Comparación de las células Lt-NES. A y B: Células Lt-NES generadas por Koch et al. 2009. C, D, E y F: Células Lt-NES obtenidas de diferentes tandas de diferenciación. C, D y E con ampliación x20. F con ampliación x10.

Fue imposible diferenciar las células Lt-NES a neurona ni expandirlas en número suficiente para los experimentos propuestos. Una causa fue el levantamiento de las células con el cambio del medio, probablemente a causa de la degradación de los stocks de poli-L-ornitina y la otra, contaminación de micoplasmas inoportunos (figura 16).



2

	READ 1	READ 2	RATIO	SYMBOL
EB 3 exp P1 03/05/18 Jon	10499	5139	0,49	NEG
EB 3 exp P2 03/05/18 Jon	4351	5828	1,34	POS
CONTROL +	4486	58090	12,95	POS
CONTROL -	7213	3765	0,52	NEG

Figura 16: Problemas con la expansión de las células Lt-NES. 1A: Células antes de cambiarles el medio. 1B: Células después de haberles cambiado el medio. Visto al microscopio con el objetivo x10. 2: Resultado positivo de contaminación por micoplasmas.

4.2. Caracterización de los precursores neuronales (Lt-NES).

Aunque no fue posible la expansión de las células Lt-NES, se obtuvieron células con morfología aparente de Lt-NES que se quisieron caracterizar. Para ello, se estudió la expresión de distintos marcadores característicos del linaje neural y de pluripotencia. Se estudió el factor de transcripción asociado a pluripotencia *REX1* y como marcadores de precursor neuronal los factores de transcripción *SOX1*, *PAX6*, y la proteína de filamento intermedio *NESTIN*. Para ello se utilizaron las técnicas PCR, qPCR y citometría de flujo, y se realizó en hESCs y en células Lt-NES.

De este modo, se quiso seguir el cambio en la expresión durante el proceso de diferenciación y más concretamente, a lo largo del proceso de mantenimiento y expansión en las células Lt-NES (figura 17). Esto se pudo llevar a cabo estudiando las células Lt-NES con distinto número de pasajes (P1-P3).

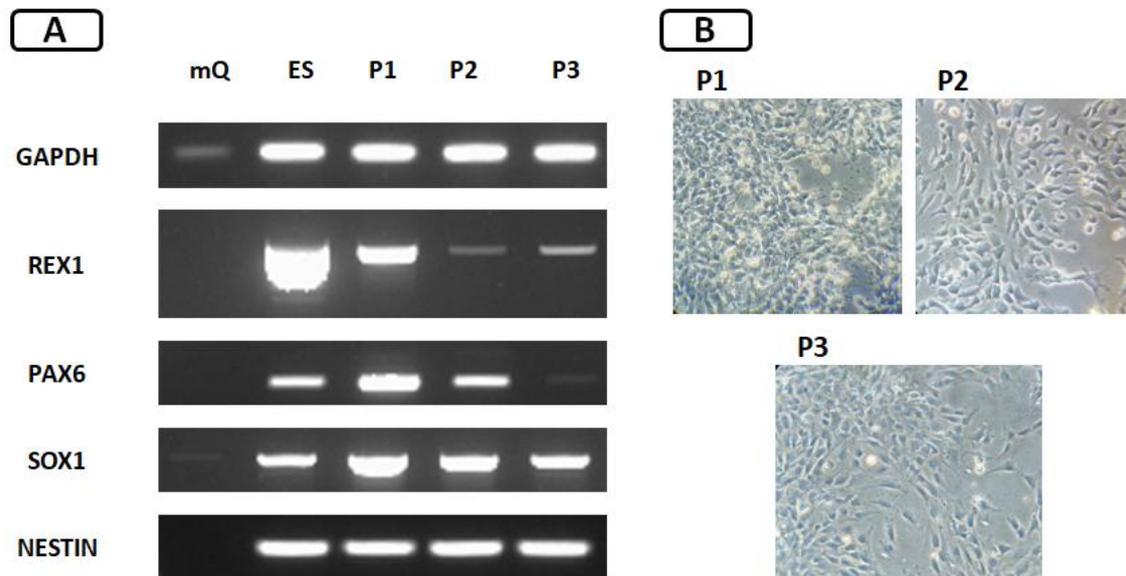


Figura 17: Caracterización mediante PCR de las células Lt-NES obtenidas. A: Estudio de expresión de *REX1*, *PAX6*, *SOX1* y *NESTIN* en células hESCs (ES) y células Lt-NES con 1 pasaje (P1), 2 pasajes (P2) y 3 pasajes (P3). Se usó como control positivo de la PCR el gen GAPDH y como control negativo para cada pareja de cebadores una muestra de agua mili-Q. Las células Lt-NES P1 y P2 son de la misma tanda de diferenciación, mientras que las células Lt-NES P3 son de otra tanda. B: Imagen de las células Lt-NES previa a la extracción de ARN para el posterior estudio. Ampliación 10x.

Para el marcador de pluripotencia *REX1*, se observó una banda de gran intensidad y tamaño para las células hESCs y esta fue disminuyendo cuanto mayor era el número de pasajes de las células Lt-NES. Estos resultados fueron los esperados ya que la pluripotencia va disminuyendo con la diferenciación celular.

En el caso de los marcadores de precursor neuronal *SOX1*, *PAX6* y *NESTIN*, se obtuvo amplificación en todo los tipos celulares aunque en el caso de *PAX6*, en el pasaje 3 se observa una banda muy poco intensa. Como se ha mencionado en la figura 17, las células Lt-NES no pertenecen a la misma tanda de diferenciación por lo que pueden no seguir la expresión propia de un avance en la diferenciación.

Para *PAX6* y *SOX1*, las bandas obtenidas podrían indicar una mayor expresión en las células Lt-NES en comparación con las hESCs (figura 17), pero serían necesarios análisis cuantitativos para poder afirmar esto. Para *NESTIN* la banda que se obtiene es similar para todos los tipos celulares.

4.2.1. Caracterización de las células Lt-NES mediante qPCR.

Se decidió hacer una qPCR para poder cuantificar los niveles de expresión del marcador *NESTIN* al no observar ninguna diferencia entre los distintos tipos celulares con el ensayo de PCR. El ensayo de PCR realizado nos proporcionaba para *NESTIN* unas bandas similares para todas las muestras y previamente, durante la optimización del protocolo, ya se observó esta similitud de expresión durante el proceso de diferenciación. Los resultados que se esperaban era un aumento de la expresión de *NESTIN* con el avance de la diferenciación.

NESTIN es un marcador utilizado con frecuencia para caracterizar las células Lt-NES (51). Según datos publicados, *NESTIN* se expresa también en hESCs pero aumenta su expresión durante la diferenciación de hESCs a células Lt-NES (52). Para descartar posibles problema en los cebadores, se compararon los utilizados en el ensayo de PCR con otros descritos por Noisa et al. 2010 (52).

Tras comprobar por PCR que los cebadores descritos por Noisa et al. 2010, a partir de ahora denominados Noisa, sí amplificaban, se pasó a optimizar las condiciones para la qPCR de ambos cebadores y establecer las rectas de calibrado para los mismos. Para esto, se uso como material genético una muestra de hESCs, por expresar *NESTIN* y disponer de mayor cantidad que otras muestras. Se probaron 4 diluciones distintas (1:3, 1:9, 1:27 y 1:81) y se llevo a cabo la reacción con un suplemento de Magnesio o con agua MiliQ.

Con los datos obtenidos se validó el método $\Delta\Delta C_t$ el cual, pretende descartar que las diferencias en la expresión de un gen sean debidas a diferencias en las eficiencias de los distintos procesos de PCR. La validación tuvo lugar gracias al valor de la pendiente obtenida por las diluciones seriadas de la muestra, resultante de representar C_t frente al logaritmo de la concentración de cDNA. Este valor está, a su vez, relacionada con la eficiencia. Por lo tanto, lo que se busca es un valor de la pendiente para el cual la eficiencia sea cercana a 1.

Los resultados (figura 18) indican que la muestra a analizar debe utilizarse con una dilución, de aproximadamente, 1:20 en ambos casos. Sobre el suplemento de magnesio, se debe añadir con los cebadores *NESTIN* mientras que en los de Noisa no es necesario. Con las condiciones ya establecidas, se pasó a realizar el ensayo de qPCR con las muestras utilizadas en la PCR anterior (figura 19). De este modo, se pudo cuantificar la expresión de *NESTIN* en los diferentes tipos celulares.

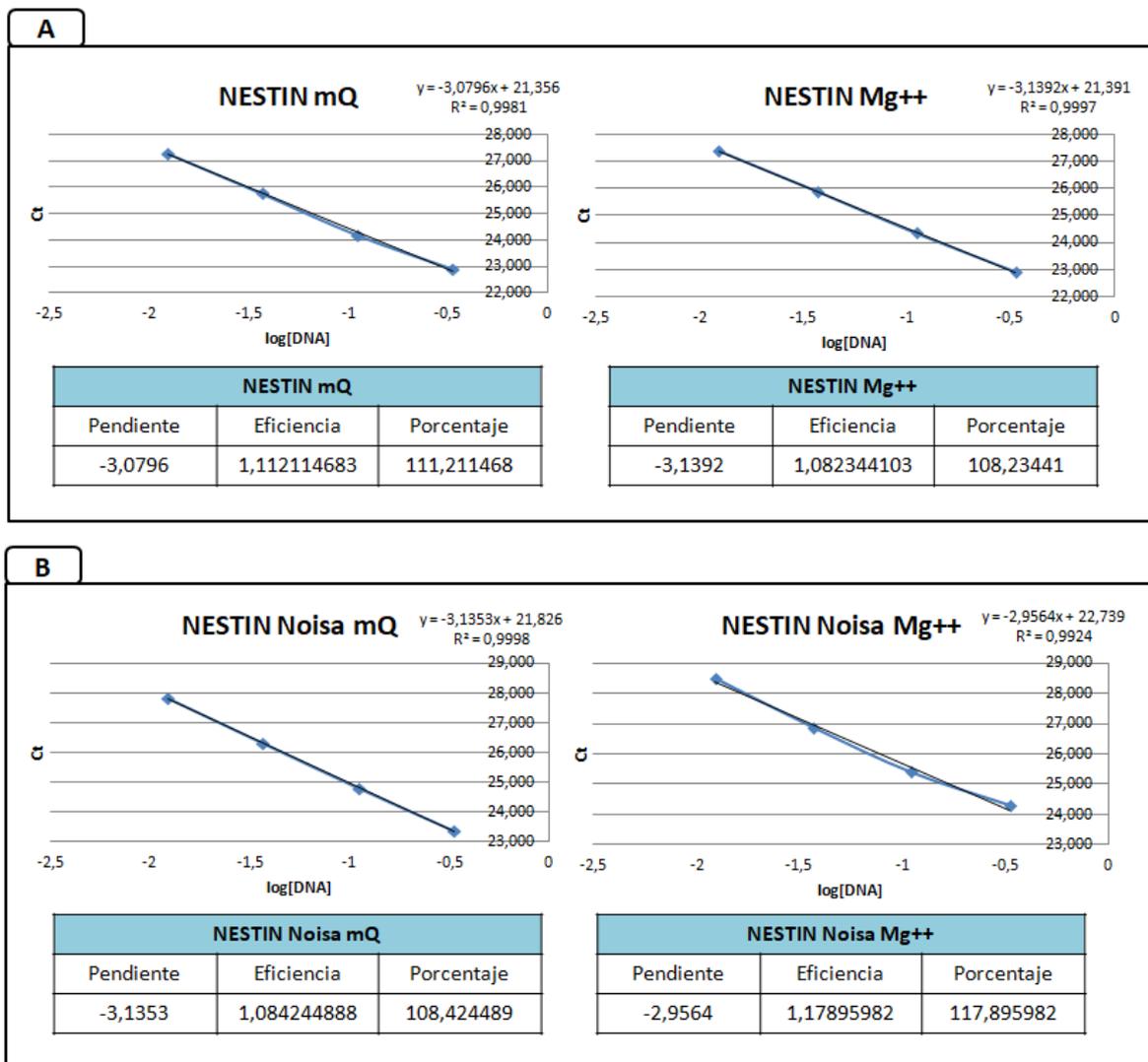


Figura 18: Rectas de calibrado para los cebadores de NESTIN. A: Recta de calibrado para *NESTIN*, el par de cebadores utilizados en el ensayo de PCR. **B:** Recta de calibrado para *NESTIN* Noisa, el par de cebadores descritos por Noisa et al. 2010.

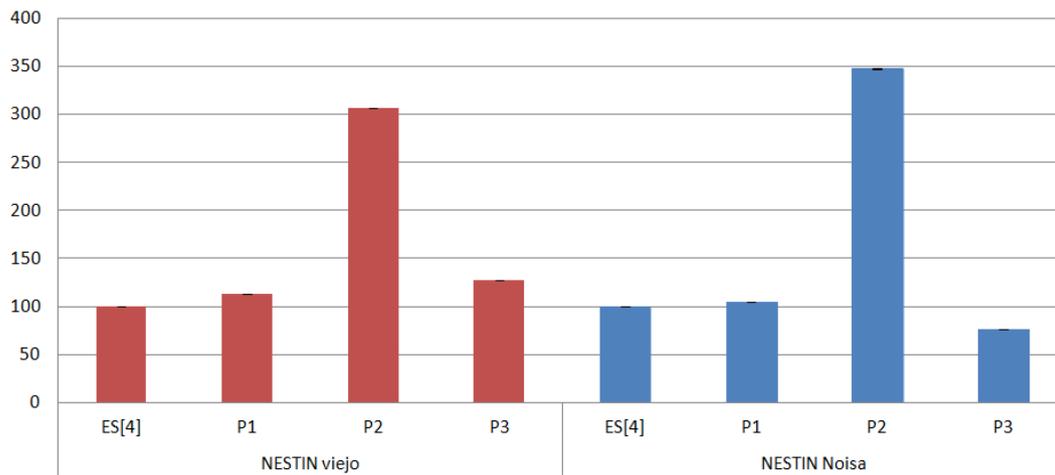


Figura 19: Resultado de la qPCR para los cebadores de NESTIN utilizados. Tomado como gen de referencia el gen GAPDH. Normalización de los datos frente a las hESCs. Representada en el diagrama la desviación típica para cada muestra.

Como muestra la figura 19, tanto *NESTIN* como *NESTIN* Noisa muestran el mismo perfil de expresión para los distintos tipos celulares. Como se señaló anteriormente, las muestras P1 y P2 correspondientes a células Lt-NES, provienen de la misma tanda de diferenciación y muestran un aumento de la expresión de *NESTIN* con el avance de la diferenciación. Por tanto, observando la expresión de las células Lt-NES P3, provenientes de otra tanda de diferenciación, se aprecia la variabilidad de expresión entre las tandas.

4.2.2. Caracterización de las células Lt-NES por citometría de flujo.

El último método utilizado para la caracterización celular fue la citometría de flujo. Los anticuerpos utilizados fueron el glucoesfingolípido de superficie SSEA-4, que es un marcador característico de las hESCs, el factor de transcripción PAX6 y la proteína de filamento intermedio *NESTIN*. Estas dos últimas proteínas son características de precursores neuronales cuya localización es intracelular, por lo que se tuvo que llevar a cabo un marcaje intracelular, mientras que para SSEA-4 fue extracelular.

Este ensayo se realizó en células hESCs y en células Lt-NES. La concentración de anticuerpo utilizada para SSEA-4 fue de 0,5 µg/ml y para PAX6 y *NESTIN*, la concentración fue de 2 µg/ml. Una vez realizados los marcajes se analizaron las muestras de interés según su tamaño, complejidad celular y viabilidad. Los cuadrantes se definieron gracias al blanco es decir, por la autofluorescencia de las células y por la fluorescencia inespecífica del anticuerpo secundario (figura 20).

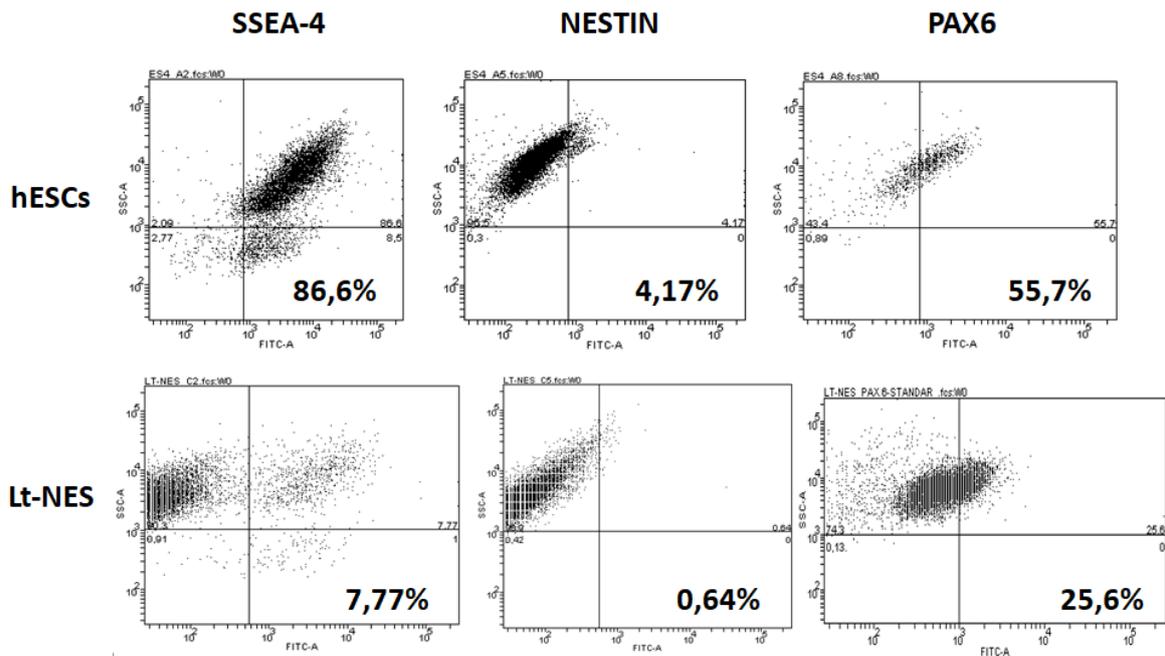


Figura 20: Resultados del marcaje con los anticuerpos SSEA-4, PAX6 y NESTIN. En la parte superior se especifica el anticuerpo con el que se ha realizado el marcaje y a la izquierda el tipo celular marcado. Resultados representados como diagrama de puntos en función de la señal de fluorescencia (FITC) y la complejidad celular (SSC).

Los resultados muestran marcaje para todos los anticuerpos en las hESCs. Más concretamente, la población positiva para el marcaje con SSEA-4 fue del 86,6%, para el marcaje con *NESTIN* un 4,17% y para PAX6 de un 55,7%. Los porcentajes para SSEA-4 y *NESTIN* son los esperados mientras que el porcentaje para PAX6 resulta bastante elevado.

En las células Lt-NES la población positiva para el marcaje con SSEA-4 fue del 7,77%, para el marcaje con PAX6 un 25,6% y finalmente, para *NESTIN* el marcaje es mayor que los controles pero se consideraría negativo. En un primer análisis, se obtuvieron unos valores muy bajos de marcaje con PAX6 y *NESTIN* en las Lt-NES. Para solucionar el problema, se cambió el reactivo Cytox por el reactivo LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain que es capaz de aguantar la fijación realizada en las células en los marcajes intracelulares. Para PAX6 sí hubo cambio en el marcaje mientras que para *NESTIN*, los valores obtenidos no se modificaron por lo que convendría probar anticuerpos de otras casas comerciales.

4.3. Obtención de precursores neuronales (NPCs).

Se quiso obtener otra línea de precursores neuronales para medir también los niveles de metilación de las copias HERV-W/MSRV y poder comparar resultados. Se realizó el seguimiento de otro protocolo, en este caso el de García-León et al. 2018 (42). Con este protocolo (descrito en el apartado 4.3 en Materiales y métodos) se obtuvieron los precursores a partir de hESCs en 10 días sin la formación de EBs (figura 21).

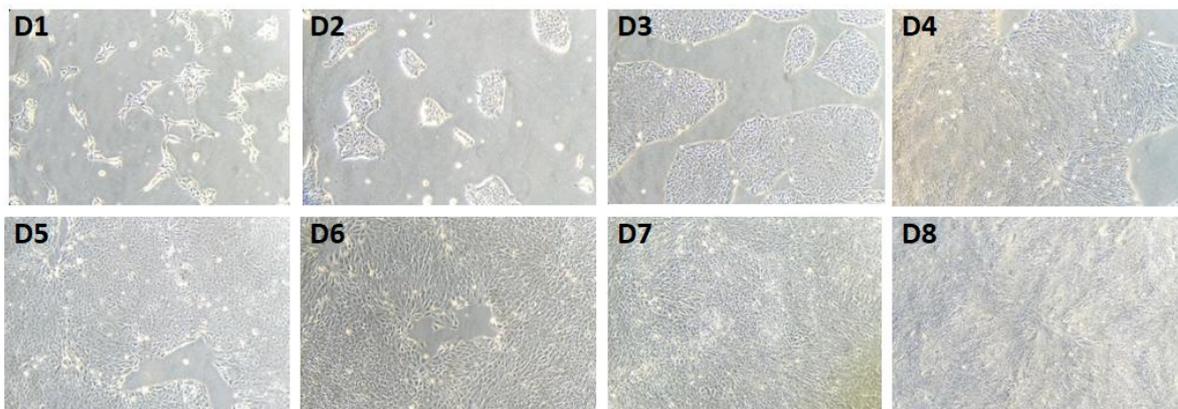


Figura 21: Diferenciación de hESCs a NPC. En la parte superior de las imágenes se indica el día del proceso de diferenciación desde el uso del medio N2B27. Visto al microscopio con el objetivo x10.

Durante el proceso de diferenciación hubo contaminación por bacterias lo que llevó a deshacerse de las tandas contaminadas.

4.3.1. Tratamiento con 5-Aza-2'-Deocitidina.

Para poder estudiar la relación entre los niveles de metilación de HERV-W/MSRV y su expresión, se sometió a los precursores neuronales (NPCs) obtenidos a un tratamiento con el compuesto 5-Aza-2'-Deocitidina. Al tratar con este compuesto, como inhibe enzimas involucradas en el proceso de metilación, se podrían observar las posibles variaciones en la expresión, al modificar los niveles de metilación. Los tiempos y concentraciones con los que se trataron las células fueron elegidos tomando como referencia los optimizados previamente en el laboratorio para las hESCs y las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs). Las células sobrevivieron a todas las condiciones y no hubo muerte celular ni cambio en la morfología.

4.4. Niveles de metilación de HERV-W/MSRV en el cromosoma 9.

Se quiso analizar el grado de metilación de las copias de HERV-W/MSRV en el cromosoma 9, más concretamente el locus 9q22.31. Se eligió este locus al encontrarlo sobreexpresado en pacientes con esclerosis múltiple (Sofía Macías, Tesis en preparación). Para realizar dicho análisis, se llevó a cabo un protocolo de extracción de ADN genómico para luego realizar una conversión con bisulfito y finalmente, pirosecuenciar. La secuencia a estudiar (figura 22) pertenece a la región *ENV* y se amplificó con cebadores específicos biotinilados.

Forward

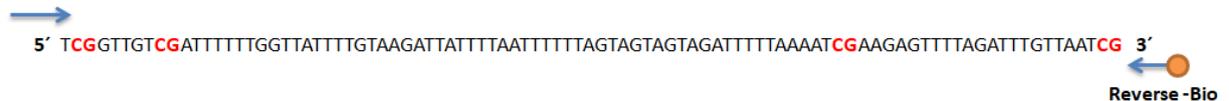


Figura 22: Secuencia convertida con bisulfito y amplificada con cebadores biotinilados. En rojo se representan los dinucleótidos CpG de los que se va a estudiar su metilación. El cebador reverse se encuentra biotinilado, lo que favorece el ensayo de pirosecuenciación al permitir purificar la secuencia.

Los resultados de la pirosecuenciación se obtuvieron en forma de pirograma (figura 23). El software del programa (PyroQ-CpG 1.09 de QIAGEN) calcula con la altura de los picos el porcentaje de metilación para cada dinucleótido CpG, el cual se obtuvo dividiendo la señal producida por la incorporación de citosinas frente a la de citosinas y timinas en cada muestra.

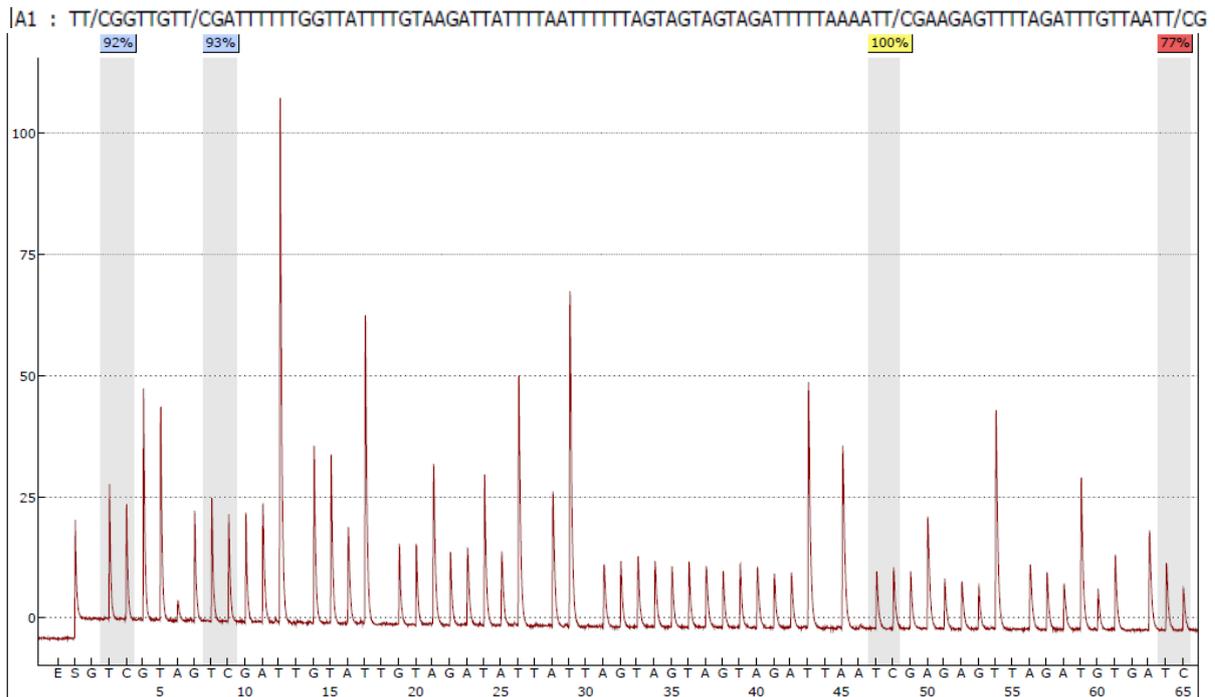


Figura 23: Pirograma obtenido de una de las muestras a estudiar. En la parte superior se encuentra la secuencia a analizar. En la parte inferior en orden, los nucleótidos dispensados por la máquina. Los CpG de interés están marcados en gris y con un porcentaje correspondiente al grado de metilación. Estos porcentajes tienen un color según la calidad del ensayo, si este es de color azul es que el ensayo cumple los requisitos seleccionados, si es amarillo debe ser revisado por el operario y si es de color rojo el ensayo no cumple con los requisitos seleccionados. Los datos representados en las siguientes figuras corresponden a la metilación global de la secuencia, haciendo una media de los cuatro valores dados, correspondientes a las posiciones CpG.

La calidad de la determinación del porcentaje de metilación, realizada por el software PyroQ-CpG 1.09, lo valora según varios criterios fundamentados en la altura de los picos, la pérdida de señal a lo largo del ensayo, la ausencia de señal en posiciones de control y la relación entre la señal observada y la secuencia analizada. El conjunto de estas variables determina la calidad de la medida y es representado por los colores azul, amarillo y rojo (figura 23). En el caso de obtener en el pirograma porcentajes en color rojo, estos se analizaron manualmente y si los picos observados en el pirograma fueron poco intensos o no estaban definidos, se eliminaron esos valores a la hora de realizar la media del porcentaje de metilación.

En este estudio se compararon las líneas celulares hESCs, Lt-NES y NPCs, NPCs tratados con 5-Aza-2'-Deocitidina y muestras de PBMCs de pacientes de EM con controles. De cada muestra se han hecho dos (o tres) mediciones partiendo de distintas cantidades de template. Los ensayos gozan de buena reproducibilidad, dado que la desviación típica media entre todas las muestras analizadas es de $3,003 \pm 1,808$.

Se estudió la metilación de la copia de HERV-W/MSRV en el cromosoma 9 de las células hESCs, Lt-NES y NPCs (figura 24), y de los NPCs tratados con 5-Aza-2'-Deocitidina. De este modo, se quiso comparar la metilación en los distintos tipos celulares.

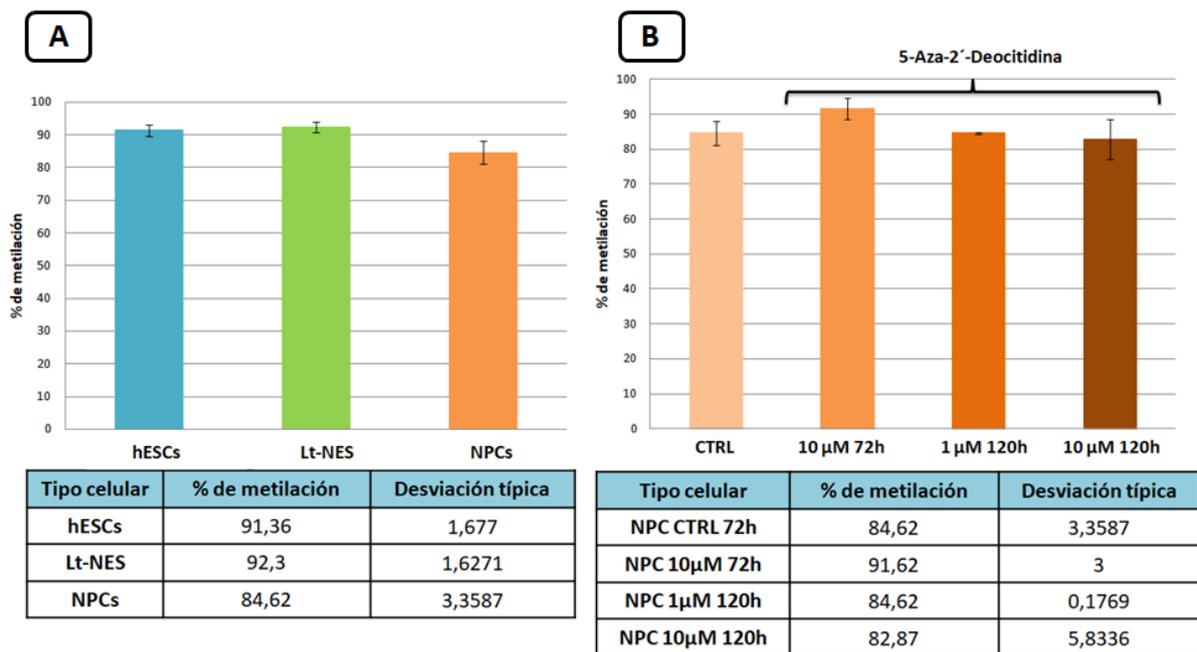


Figura 24: Grado de metilación de la copia HERV-W en el cromosoma 9. A: Realizado en hESCs, células Lt-NES y NPCs. **B:** Las muestras analizadas fueron (por orden en el diagrama): NPCs control levantados a las 72 horas, NPCs tratados 72 horas con 10 µM, NPCs tratados 120 horas con 1 µM y NPCs tratados 120 horas con 10 µM. Se representa el promedio de los CpG a lo largo del amplicón para cada muestra obtenida por pirosecuenciación. Las hESCs y células Lt-NES se analizaron tres veces mientras que las NPCs solo 2 veces, los valores de la desviación típica se indican en la tabla.

El análisis indicó que los niveles de metilación de este locus para los tipos celulares hESCs y Lt-NES fueron bastante elevados, superando un 90% de metilación mientras que para los NPCs este valor también fue muy elevado pero de un 85%. Para los NPCs tratado con y sin 5-Aza-2'-Deocitidina (figura 24, B), los niveles de metilación estuvieron entre el 80-90%. No se encontraron diferencias a nivel de metilación de este locus entre los NPCs tratados y sin tratar.

Previamente se estudió en el laboratorio la metilación de la copia de HERV-W/MSRV en el cromosoma 9, en PBMCs de pacientes con esclerosis múltiple y controles (Sofía Macías y Jon Schoorlemmer, datos sin publicar). Los pacientes se dividían a su vez en pacientes con EM y pacientes CIS (figura 25).

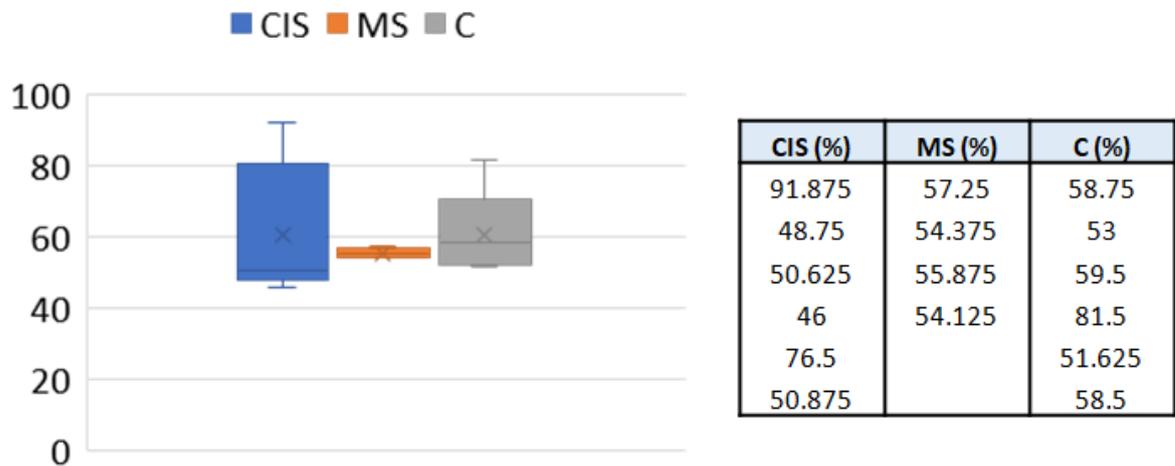


Figura 25: Grado de metilación de la copia HERV-W en el cromosoma 9. Estudio realizado en PBMCs de pacientes CIS (CIS), pacientes con esclerosis múltiple (MS) y controles (C). En la tabla se representan los valores promedio de los CpG a lo largo del amplicón para cada muestra obtenida por pirosecuenciación. Cada muestra se analizó 2 veces.

Los resultados obtenidos (figura 25) para la copia HERV-W/MSRV del cromosoma 9 indicaban que los niveles de metilación variaban enormemente entre diferentes muestras. Observando los pirogramas se encontraron dos patrones distintos (figura 26).

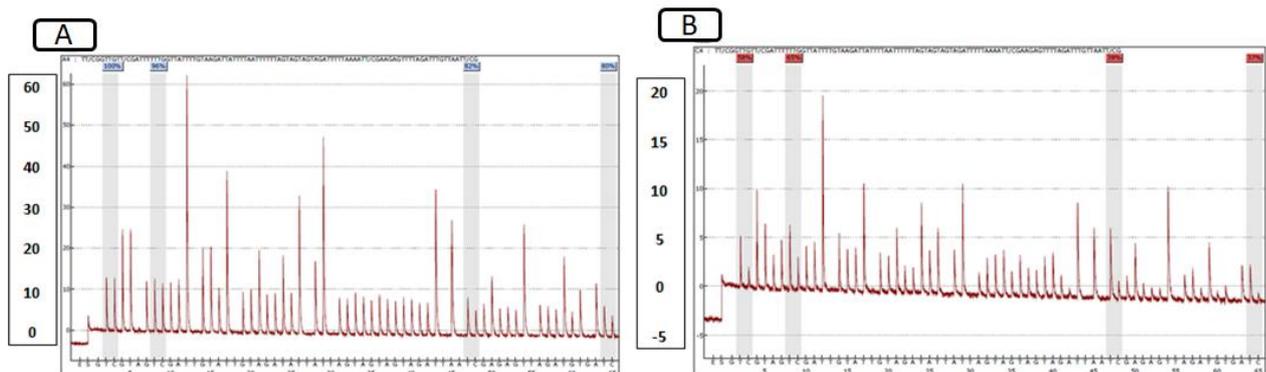


Figura 26: Patrones de pirogramas obtenidos. **A:** Pirograma con alta intensidad de señal y altos niveles de metilación. **B:** Pirograma con baja intensidad de señal y bajos niveles de metilación. En el eje de los pirogramas se ha añadido una tabla con números que representan la intensidad de señal.

Por un lado se encontraban pirogramas con una intensidad de señal muy alta y niveles de metilación altos (figura 26, A) y por otro lado, pirogramas con la intensidad de señal muy baja y unos niveles de metilación también bajos (figura 26, B). El análisis demostrado en B, mostraba también picos cuya altura no coincidían con la secuencia programada.

Se pensaron dos posibles explicaciones para la obtención de dos patrones diferentes. Una explicación era una posible variación genética en el locus estudiado y la otra, un fallo en la pirosecuenciación. Primero se estudió si había una variación genética realizando una secuenciación masiva (IonTorrent) del amplicón de interés. Entre todas las secuencias obtenidas, se eligieron al azar 21 y se alinearon con la secuencia conocida del locus (figura 27).

```

[71.31    AGTTAATTTAGAATTATTATTGAGAAAAGTT-AAAGAAATTCGAGATTGAATATAACCGTAG    139
[71.7     AGTTAATTTAGAATTATTATTGAGAAAAGTTAAAGAAAATTCGAGATTGAATATAACCGTAG    221
[71.17    AGTTAATTTAGAATTATTATTGAGAA-AGTTAAAGAAATTCGAGATTGAATATAACCGTAG    219
[71.1     AGTTAATTTAGAATTATTATTGAGGAAAGTTAAAAGAAAATTTGAGATTGAATATAACCGTAG    86
[71.25    AGTTAATTTAGAATTATTATTGAGAAAAGTT-AAAGAAATTCGAGATTGAATATAACCGTAG    188
[71.29    AGTTAATTTAGAATTATTATTGAGAAAAGTT-AAAGAAATTCGAGATTGAATATAACCGTAG    199
[71.3     AGTTAATTTAGAATTATTATTGAGAAAAGTT-AAAGAAATTTGAGATTGAATATAACCGTAG    115
[71.35    AGTTAATTTAGAATTATTATTGAGAAAATTCGAGATTGAATATAACCGTAG    119
[71.37    AGTTAATTTAGAATTATTATTGAGAAAAGTT-AAAGAAATTCGAGATTGAATATAACCGTAG    113
[71.19    AGTTAATTTAGAATTATTATTGAGAAAAGTT-AAAGAAATTCGAGATTGAATATAACCGTAG    197
[71.13    AGTTAATTTAGAATTATTATTGAGAAAAGTT-AAAGAAATTCGAGATTGAATATAACCGTAG    232
[71.27    AGTTAATTTAGAATTATTATTGAGAAAAGTT-AAAGAAATTTGAGATTGAATATAACCGTAG    232
[71.39    AGTTAATTTAGAATTATTATTGAGAAAAGTT-AAAGAAATTCGAGATTGAATATAACCGTAG    104
[71.21    AGTTAATTTAGAATTATTATTGAGAAAAGTT-AAAGAAATTTGAGATTGAATATAACCGTAG    234
[71.5     AGTTAATTTAGAATTATTATTGAGAAAAGTT-AAAGAAATTTGAGATTGAATATAACCGTAG    95
[71.15    AGTTAATTTAGAATTATTATTGAGAAAAGTT-AAAGAAATTTGAGATTGAATATAACCGTAG    220
[71.23    AGTTAATTTAGAATTATTATTGAGAAAAGTT-AAAGAAATTCGAGATTGAATATAACCGTAG    143
[71.33    AGTTAATTTAGAATTATTATTGAGAAAAGTT-AAAGAAATTCGAGATTGAATATAACCGTAG    123
[71.9     AGTTAATTTAGAATTATTATTGAGAAAAGTT-AAAGAAATTCGAGATTGAATATAACCGTAG    228
[71.11    AGTTAATTTAGAGTTATTATTGAGAAAAGTT-AAAGAAATTCGAGATTGAATATAACCGTAG    229
[71.41    AGTTAATTTAGAATTATTATTGAGAAAAGTT-AAAGAAATTCGAGATTGAATATAACCGTAG    98
[HERVW9   AGTTAATTTAGAATTATTATTGAGAAAAGTT-AAAGAAATTCGAGATTGAATATAACCGTAG    229
*****

```

Figura 27: Alineamiento de secuencias. Se amplificó la secuencia de HERV-W/MSRV del cromosoma (Figura 22) de la muestra 71 (correspondiente a un paciente MS) y se secuenció mediante la técnica IonTorrent. Secuencias individuales elegidas al azar fueron alineados con la secuencia del amplicón convertido con bisulfito "in silica" (HERVW9).

Las secuencias estudiadas correspondían al amplicón de interés, por lo que se concluyó que no había una variante génica. Tras esta comprobación, se repitió el análisis de las muestras para descartar el posible fallo en la pirosecuenciación. Para ello, analicé los niveles de metilación de la copia HERV-W/MSRV del cromosoma 9 en 5 muestras de pacientes y 5 de controles.

Se procuró partir de material suficiente para que se obtuvieran señales intensas en el pirograma. Esto se comprobó mediante la visualización del producto de PCR en gel de agarosa (datos no mostrados). Al obtener los pirogramas, se pudieron observar diferencias con los obtenidos en el primer análisis (figura 28).

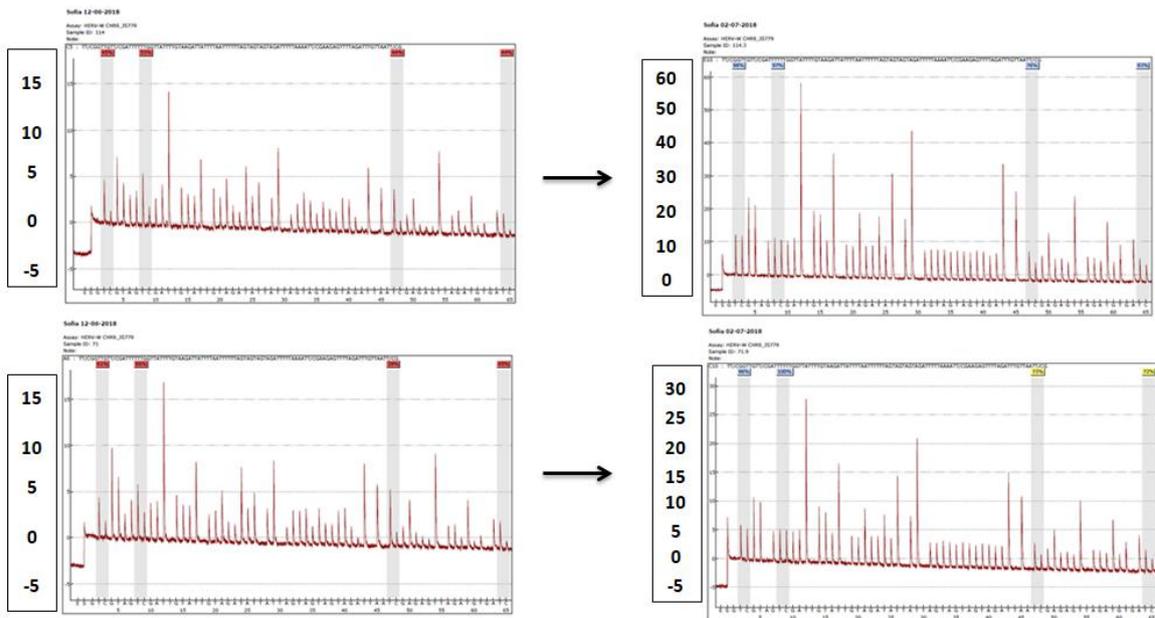
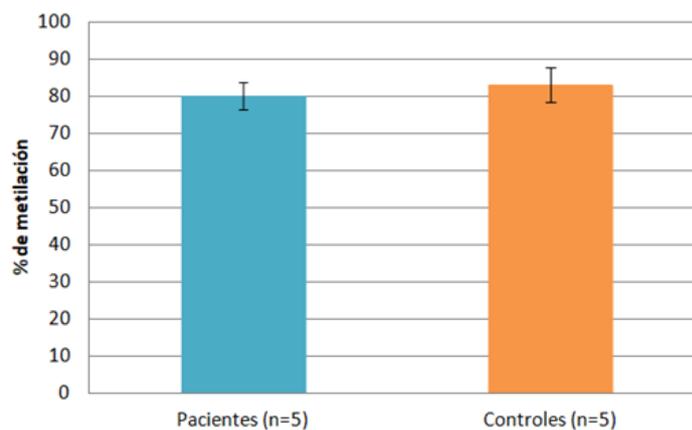


Figura 28: Comparación de pirogramas obtenidos para la misma muestra en dos ensayos diferentes. A la derecha se muestran las muestras analizadas en el primer ensayo y a la derecha, las mismas muestras analizadas por segunda vez. En el eje de los pirogramas se ha añadido una tabla con números que representan la intensidad de señal.

Los pirogramas de la figura 28, muestran una mayor intensidad en la señal de los picos así como niveles de de metilación más altos para el segundo análisis de las muestras. Los niveles de metilación del locus se muestran en la figura 29.



Tipo celular	% de metilación	Desviación típica
PBMCs pacientes	80,1	3,75
PBMCs controles	83,15	4,60

Figura 29: Grado de metilación de la copia HERV-W en el cromosoma 9 de PBMCs de pacientes con EM y controles. Se representa el porcentaje global de metilación de la secuencia de interés para cada grupo (pacientes y controles). Cada muestra se analizó dos veces y en la tabla se indica la desviación típica del promedio de cada grupo.

Se obtuvieron unos niveles de metilación en pacientes del 80% y en controles del 83%. Por tanto, queda reflejado que el nivel de metilación para el locus 9q22.31 no es menor para los pacientes con esclerosis múltiple, por lo que no podríamos relacionar este mecanismo de regulación génica con la sobreexpresión encontrada en pacientes.

5. DISCUSIÓN

5.1. Obtención de los precursores neuronales (Lt-NES).

Siguiendo el protocolo de Koch et al. 2009 (41) se generaron las células Lt-NES (long term neuroepithelial stem cells). Estas células mantienen una alta tasa de proliferación, sin perder sus características neuronales, como la expresión de marcadores típicos de precursores neuroepiteliales (PAX6, SOX1, *NESTIN*) (41). Por estas características, sirven para generar más adelante modelos celulares para el estudio de enfermedades neurodegenerativas, como la esclerosis múltiple.

Uno de los puntos claves durante el desarrollo del protocolo es la formación de EBs. Se encontró mucha diversidad de tamaño entre los EBs obtenidos. A su vez, el tamaño influyó a la hora de formarse las rosetas (38). Como se ha mostrado en resultados (figura 13), EBs de tamaño pequeño y poca complejidad volvían a generar colonias celulares parecidas a las colonias de hESCs. Otro problema asociado al tamaño de los EBs, fue la generación de rosetas en distintos tiempos por EBs plaqueados el mismo día. Esto podría deberse a que EBs de tamaño y densidad distinta difunden con diferente velocidad hacia su interior los compuestos que favorecen la diferenciación (53).

Por lo tanto, para futuros experimentos conviene evitar esta variabilidad y aplicar métodos que permiten la formación de EBs del mismo tamaño. De este modo, se podría reducir el proceso de diferenciación obteniendo las rosetas hacia el mismo día del protocolo. Como posibles soluciones se encuentra un método desarrollado por Ouyang et al. 2015 (54) de impresión 3D de “bloques” de hESCs, que permitían obtener EBs uniformes y homogéneos. Como esta solución es eficaz pero bastante costosa, una alternativa sería sembrar densidades celulares idénticas en pocillos de tamaño muy pequeño. Esto podría reducir la variabilidad en el tamaño de formación de EBs pero no sería un método infalible.

5.2. Caracterización de las células Lt-NES.

Una vez generadas las células Lt-NES se quisieron caracterizar mediante la expresión de marcadores característicos del linaje neural como son PAX6, SOX1 y *NESTIN*. Esta caracterización se llevó a cabo a través de tres técnicas: PCR, qPCR y citometría de flujo.

Para los ensayos de PCR, también se analizaron las hESCs y se estudió la expresión de otro marcador, pero en este caso de pluripotencia, *REX1*. En general, se observó una disminución de la expresión de *REX1*, así como un aumento de expresión de los marcadores *PAX6*, *SOX1* y *NESTIN* con el avance de la diferenciación de hESCs a Lt-NES. Pero también se observaron bandas intensas (figura 17) es decir, valores considerables de expresión de *PAX6*, *SOX1* y *NESTIN* por parte de las hESCs y de *REX1* por parte de las células Lt-NES P1. Cabe destacar que la técnica de PCR utilizada no nos permite una cuantificación precisa debido a su baja sensibilidad, por lo que para poder cuantificar los niveles de expresión habría que realizar una qPCR.

Una posible explicación de una detección positiva para marcadores de precursor neuronal en hESC (figura 17), es que un bajo porcentaje las células inician un proceso de diferenciación. En el caso contrario, de expresión de *REX1* por parte de las células Lt-NES, puede deberse al proceso de levantamiento de rosetas. El método utilizado favorece el levantamiento de las rosetas pero conlleva el levantamiento de otras células *REX1* positivas menos diferenciadas. Se necesitan varios pasajes para poder homogeneizar los cultivos. Esto también explicaría una mayor expresión de las células Lt-NES con dos pasajes que con uno (figura 19), con la técnica qPCR.

Después de los resultados obtenidos con las diferentes técnicas utilizadas queda visible la variabilidad tanto morfológica como de expresión de marcadores neuronales entre las tandas de diferenciación. Esta variabilidad, aparte de por lo explicado, se debe al paso de formación de EBs durante el protocolo. Se podría solventar siguiendo otro tipo de protocolos como el descrito por García-León et al. 2018 (42), en el que se obtienen los precursores neuronales en unos 10 días y no es necesaria la formación de EBs.

Para completar los resultados se podría estudiar la expresión de todos los marcadores mediante qPCR para obtener más información. También sería necesario expandir las Lt-NES y someterlas a muchos pasajes para comprobar que proliferan indefinidamente sin diferenciarse y mantienen las propiedades neurogénicas estables (51). Gracias a las características de este tipo celular es una herramienta muy valiosa en el estudio de enfermedades relacionadas con la neurodegeneración, como es la esclerosis múltiple.

Uno de los objetivos al comenzar el protocolo de diferenciación fue la obtención de neuronas a partir de las células Lt-NES generadas. Esta diferenciación se iba a llevar a cabo con un protocolo descrito por Tornero et al. 2013 (55) por el cual se obtenían neuronas funcionales. El interés de obtener neuronas funcionales a partir de hESCs es poder realizarlo en iPSCs de pacientes. Estudios realizados en neuronas obtenidas a partir de células de pacientes, daría aún más información en el estudio de enfermedades. En nuestro caso sería interesante estudiar la relación de los retrovirus endógenos humanos con el desarrollo de esclerosis múltiple en este tipo celular.

5.3. Niveles de metilación de HERV-W/MSRV en el cromosoma 9.

Se quiso estudiar la metilación de una de las copias de HERV-W/MSRV, más concretamente la del cromosoma 9 que es el locus 9q22.31. Se eligió este locus al encontrarlo sobreexpresado en pacientes. La secuencia a estudiar codifica para una proteína de la envuelta (ENV) que se encontraba sobreexpresada en paciente con esclerosis múltiple (Sofía Macías, Tesis en preparación). Para los ensayos de metilación, se hicieron análisis por duplicado o triplicado de cada muestra. Lo ideal sería realizar más mediciones para aumentar el número de datos resultantes, haciéndolos más fiables.

Los niveles de metilación para el locus estudiado en hESCs, células Lt-NES y NPCs fueron muy elevados, del 85-90% (figura 24, A). Observada una disminución de la metilación en copias de HERVs relacionadas con patologías (25), induce a pensar que en condiciones fisiológicas estas copias se encuentran hipermetiladas. Los resultados obtenidos corroborarían esa explicación.

El tratamiento de los NPCs con 5-Aza-2'-Deocitidina no alteró los niveles de metilación en el locus estudiado (figura 24, B), obteniendo unos valores entre el 80 y 90%. El compuesto utilizado para el tratamiento inhibe la metilación del ADN formado, por lo que se esperarían unos resultados de hipometilación. Hace falta analizar marcadores alternativos para mostrar la eficacia del tratamiento con 5-Aza-2'-Deocitidina. Pendiente dicho control, parece que se trata de secuencias con un nivel de metilación muy alto y muy estable, y quizás poco susceptible a regulación por metilación.

En el caso de los niveles de metilación obtenidos para los pacientes y los controles, los valores han sido muy elevados en ambos tipos, de un 80% (figura 29). Los resultados esperados serían unos niveles de hipometilación para poder explicar la expresión en pacientes. El grupo de investigación (Sofía Macías, Tesis en preparación) estudió otros locus también sobreexpresados en pacientes, tanto a nivel de metilación como de expresión. Los datos obtenidos revelan que la metilación genómica en los locus HERV-W seleccionados no es diferente en pacientes de EM comparado con controles. Por tanto, puede que la expresión de estos elementos retrovirales no esté regulada por la metilación y estén involucrados otros mecanismos.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo han permitido extraer las siguientes conclusiones:

1. Las células Lt-NES obtenidas mediante el protocolo descrito por Koch et al. 2009, presenta una variabilidad morfológica como en los niveles de expresión a marcadores específicos, entre las tandas de diferenciación.
2. Las células Lt-NES expresan los marcadores específicos de precursores neuronales (*SOX1*, *PAX6* y *NESTIN*).
3. En mis manos, la expresión de *NESTIN* se detectó con facilidad en hESCs y su inducción en células Lt-NES fue mínima.
4. La copia de HERV-W/MSRV en el cromosoma 9 se encuentra hipermetilada en hESCs, células Lt-NES y NPCs. Los niveles de metilación observados rondan el 90%.
5. El tratamiento con el compuesto 5-Aza-2'-Deocitidina a una concentración de 10 μM durante 72 horas, y 10 μM y 1 μM durante 120 horas, no resulta en la desmetilación de la copia HERV-W/MSRV del cromosoma 9 en los precursores neuronales obtenidos mediante el protocolo de García-León et al. 2018.
6. Los niveles de metilación de la copia HERV-W/MSRV del cromosoma 9 en PBMCs, no varía entre pacientes de esclerosis múltiple y controles. En ambos casos se encuentra los valores elevados, en torno al 80%.

CONCLUSIONS

I reached the following conclusions based on the results obtained:

1. Lt-NES cells generated according to the protocol described by Koch et al. 2009, presents a morphological variability as in specific markers level expression, between the differentiation stages.
2. Lt-NES cells express neural precursors specific markers (*SOX1*, *PAX6* and *NESTIN*).
3. In my hand, *NESTIN* expression was easily detected in hESCs and its induction in Lt-NES was minimal.
4. The HERV-W/MSRV copy in chromosome 9 is hypermethylated in hESCs, Lt-NES cells and NPCs. Methylation levels were around 90%.
5. The treatment with the compound 5-Aza-2'-Deocytidine at different concentrations (10 μ M for 72 hours, 10 μ M for 120 hours and 1 μ M for 120 hours) does not result in demethylation of the HERV-W/MSRV copy in chromosome 9 in NPCs generated by the protocol of García-León et al. 2018.
6. Methylation levels of the HERV-W/MSRV copy in chromosome 9 doesn't vary among PBMCs of MS patients and controls. In both cases, high values were found, around 80%.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lassmann H, Brück W, Lucchinetti CF. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol.* 2007; 17(2):210-8.
2. Kempainen A, Sawcer S, Compston A. Genome-wide association studies in multiple sclerosis: lessons and future prospects. *Brief Funct Genomics.* 2011; 10(2):61-70.
3. Cotsapas C, Mitrovic M. Genome-wide association studies of multiple sclerosis. *Clinical & Translational Immunology.* 2018; 7:e1018.
4. Greter M, Heppner FL, Lemos MP et al. (2005). Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nat Med* 11: 328–334.
5. Traugott U, Reinherz EL, Raine CS. Multiple sclerosis: distribution of T cell subsets within active chronic lesions. *Science.* 1983 Jan 21; 219(4582):308-10.
6. Lagumersindez Denis N, Oviedo Galvez ME, Martinez Sanchez G. Esclerosis múltiple: aspectos generales y abordaje farmacológico. *Rev Cubana Farm.* 2009, vol.43, n.2.
7. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. *Neurology.* 1996; 46:907-911.
8. National Multiple Sclerosis Society. Clinically isolated syndrome (CIS). <http://www.nationalmssociety.org/about-multiple-sclerosis/what-we-know-about-ms/diagnosing-ms/cis/index.aspx>.
9. Pericot I, Montalban X. Esclerosis múltiple. *Med Integr.* 2001; 38:18-24.
10. Antonio García Merino J. Current therapy of multiple sclerosis. *Medicina Clínica.* 2014 Dec; 143 Suppl 3:19-22.
11. Yadav SK, Mindur JE, Ito K, Dhib-Jalbut S. Advances in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol.* 2015 Jun; 28(3):206-19.
12. Correale J, Gaitán MI. Multiple sclerosis and environmental factors: the role of vitamin D, parasites, and Epstein-Barr virus infection. *Acta Neurol Scand.* 2015; 132(199):46-55.
13. Antony JM, DesLauriers AM, Bhat RK, Ellestad KK, Power C. Human endogenous retroviruses and multiple sclerosis: Innocent bystanders or disease determinants?. *Biochimica et Biophysica Acta* 1812. 2011; 162-176.
14. Hayward A, Cornwallis CK, Jern P. Pan-vertebrate comparative genomics unmask retrovirus macroevolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2015 Jan 13; 112(2):464-9.
15. Grandi N, Tramontano E. Type W Human Endogenous Retrovirus (HERV-W) integrations and their mobilization by L1 machinery: contribution to the human transcriptome and impact on the host physiopathology. *Viruses.* 2017; 9, 162.

16. Sentís C. Retrovirus endógenos humanos: Significado biológico e implicaciones Evolutivas. *Arbor* CLXXII, 677 (Mayo), 135-166 pp.
17. Bock M, Stoye JP. Endogenous retroviruses and the human germline. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2000 Dec; 10(6):651-5.
18. Mamei G, Poddighe L, Astone V, Delogu G, Arru G, Sotgiu S, Serra C, Dolei A. Novel reliable real-time PCR for differential detection of MSRVenv and syncytin-1in RNA and DNA from patients with multiple sclerosis. *Journal of Virological Methods* 161. 2009; 98–106.
19. Colmegna I, Garry RF. Role of endogenous retroviruses in autoimmune diseases. *Infect Dis Clin N Am* 20. 2006; 913–929.
20. Perron H, Lang A. The human endogenous retrovirus link between genes and environment in multiple sclerosis and in multifactorial diseases associating neuroinflammation. *Clinic Rev Allerg Immunol*. 2010; 39:51–61.
21. Goff SP. Retrovirus restriction factors. *Mol Cell*. 2004 Dec 22; 16(6):849-59.
22. Hurst TP, Magiorkinis G. Epigenetic control of human endogenous retrovirus expression: focus on regulation of Long-Terminal Repeats (LTRs). *Viruses*. 2017 May 31; 9(6).
23. Phillips T. The Role of Methylation in Gene Expression. *Nature Education*. 2008; 1(1):116
24. Matouskova M, Blazkova J, Pajer P, Pavlicek A, Hejnar J. CpG methylation suppresses transcriptional activity of human syncytin-1 in non-placental tissues. *Exp. Cell Res*. 2006; 312, 1011 – 1020.
25. Küçükali Cİ, Kürtüncü M, Çoban A, Çebi M, Tüzün E. Epigenetics of multiple sclerosis: an updated review. *Neuromolecular medicine*. 2015; p. 83–96.
26. Christensen T. Association of human endogenous retroviruses with multiple sclerosis and possible interactions with herpes viruses. *Rev Med Virol* 2005; 15:179–211.
27. Perron H, Geny C, Laurent A et al. Leptomeningeal cell line from multiple sclerosis with reverse transcriptase activity and viral particles. *Res Virol*. 1989; 140:551–561.
28. Perron H, Lalande B, Gratacap B et al. Isolation of retrovirus from patients with multiple sclerosis. *Lancet*. 1991; 337:862-863.
29. Schmitt K, Richter C, Backes C, Meese E, Ruprecht K, Mayer J. Comprehensive analysis of human endogenous retrovirus group HERV-W locus transcription in multiple sclerosis brain lesions by high-throughput amplicon sequencing. *J Virol*. 2013 Dec; 87(24):13837-52.
30. Morandi E, Tarlinton RE, Gran B. Multiple sclerosis between genetics and infections: human endogenous retroviruses in monocytes and macrophages. *Front Immunol*. 2015 Dec 24; 6:647.
31. Dolei A. The aliens inside us: HERV-W endogenous retroviruses and multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2018 Jan; 24(1):42-47.

32. Rolland A, Jouvin-Marche E, Viret C, Faure M, Perron H, Marche P. The envelope protein of a human endogenous retrovirus-W family activates innate immunity through CD14/TLR4 and promotes Th1-like responses. *J Immunol.* 2006; 176:7636±44.
33. Kremer D, Schichel T, Forster M, Tzekova N, Bernard C, van der Valk P, et al. Human endogenous retrovirus type W envelope protein inhibits oligodendroglial precursor cell differentiation. *Ann Neurol.* 2013; 74(5):721±32.
34. Van der Star BJ, Vogel DY, Kipp M, Puentes F, Baker D, Amor S. In vitro and in vivo models of multiple sclerosis. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2012 Aug; 11(5):570-88.
35. Prajumwongs P, Weeranantanapan O, Jaroonwitchawan T, Noisa P. Human Embryonic Stem Cells: A Model for the Study of Neural Development and Neurological Diseases. *Stem Cells Int.* 2016; 2016: 2958210.
36. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998 Nov 6; 282(5391):1145-7.
37. Zhao W, Ji X, Zhang F, Li L, Ma L. Embryonic stem cell markers. *Molecules.* 2012; 17, 6196-6236.
38. Dhara SK, Stice SL. Neural differentiation of human embryonic stem cells. *J Cell Biochem.* 2008 October 15; 105(3): 633–640.
39. Elkabetz Y, Panagiotakos G, Al Shamy G, Socci ND, Tabar V, Studer L. Human ES cell-derived neural rosettes reveal a functionally distinct early neural stem cell stage. *Genes Dev.* 2008 Jan 15; 22(2):152-65
40. Chambers SM, Fasano C a, Papapetrou EP, Tomishima M, Sadelain M, Studer L. Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *October.* 2009; 27(3):275–80.
41. Koch P, Opitz T, Steinbeck JA, Ladewig J, Brüstle O. A rosette-type, self-renewing human ES cell-derived neural stem cell with potential for in vitro instruction and synaptic integration. 2009 Mar 3; 106(9): 3225-30.
42. García-León JA, Kumar M, Boon R, Chau D, One J, Wolfs E, Eggermont K, Berckmans P, Gunhanlar N, de Vrij F, Lendemeijer B, Pavie B, Corthout N, Kushner SA, Dávila JC, Lambrichts I, Hu WS, Verfaillie CM. SOX10 single transcription factor-based fast and efficient generation of oligodendrocytes from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports.* 2018 Feb 13; 10(2):655-672.
43. Massa MG, Gisevius B, Hirschberg S, Hinz L, Schmidt M, Gold R, Prochnow N, Haghikia A. Multiple Sclerosis Patient-Specific Primary Neurons Differentiated from Urinary Renal Epithelial Cells via Induced Pluripotent Stem Cells. *PLoS One.* 2016 May 9; 11(5):e0155274.

44. Koyanagi M, Takahashi J, Arakawa Y, Doi D, Fukuda H, Hayashi H, Narumiya S, Hashimoto N. Inhibition of the Rho/ROCK pathway reduces apoptosis during transplantation of embryonic stem cell-derived neural precursors. *J Neurosci Res.* 2008 Feb 1; 86(2):270-80.
45. Li X, Meng G, Krawetz R, Liu S, Rancourt DE. The ROCK inhibitor Y-27632 enhances the survival rate of human embryonic stem cells following cryopreservation. *Stem Cells Dev.* 2008 Dec; 17(6):1079-85.
46. Stover AE, Schwartz PH. The generation of embryoid bodies from feeder-based or feeder-free human pluripotent stem cell cultures. *Methods Mol Biol.* 2011; 767:391-398.
47. Bajpai R, Lesperance J, Kim M, Terskikh AV. Efficient propagation of single cells Accutase-dissociated human embryonic stem cells. *Mol Reprod Dev.* 2008 May; 75(5):818-27.
48. Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, Nishiyama A, Matsumura M, Wataya T, Takahashi JB, Nishikawa S, Nishikawa S, Muguruma K, Sasai Y. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2007 Jun; 25(6):681-6.
49. Li XJ, Zhang SC. In vitro differentiation of neural precursors from human embryonic stem cells. *Methods Mol Biol.* 2006; 331:169-77.
50. Creusot F, Acs G, Christman JK. Inhibition of DNA methyltransferase and induction of Friend erythroleukemia cell differentiation by 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine. *J Biol Chem.* 1982 Feb 25; 257(4):2041-8.
51. Falk A, Koch P, Kesavan J, Takashima Y, Ladewig J, Alexander M, Wiskow O, Taylor J, Trotter M, Pollard S, Smith A, Brüstle O. Capture of neuroepithelial-like stem cells from pluripotent stem cells provides a versatile system for in vitro production of human neurons. *PLoS One.* 2012; 7(1):e29597.
52. Noisa P, Urrutikoetxea-Uriguen A, Li M, Cui W. Generation of human embryonic stem cell reporter lines expressing GFP specifically in neural progenitors. *Stem Cell Rev.* 2010 Sep; 6(3):438-49.
53. Kinney MA, Sargent CY, McDevitt TC. The multiparametric effects of hydrodynamic environments on stem cell culture. *Tissue Eng Part B Rev.* 2011; 17(4):249–62.
54. Ouyang L, Yao R, Mao S, Chen X, Na J, Sun W. Three-dimensional bioprinting of embryonic stem cells directs highly uniform embryoid body formation. *Biofabrication.* 2015 Nov 4; 7(4):044101.
55. Tornero D, Wattananit S, Grønning Madsen M, Koch P, Wood J, Tatarishvili J, Mine Y, Ge R, Monni E, Devaraju K, Hevner RF, Brüstle O, Lindvall O, Kokaia Z. Human induced pluripotent stem cell-derived cortical neurons integrate in stroke-injured cortex and improve functional recovery. *Brain* 2013; 136; 3561–3577.

56. Zhang C, Cao J, Li X, Xu H, Wang W, Wang L, Zhao X, Li W, Jiao J, Hu B, Zhou Q, Zhao T. Treatment of multiple sclerosis by transplantation of neural stem cells derived from induced pluripotent stem cells. *Sci China Life Sci.* 2016 Sep; 59(9):950-7.
57. Laska MJ, Nissen KK, Nexø BA. (Some) cellular mechanisms influencing the transcription of human endogenous retrovirus, HERV-Fc1. *PLoS one.* 2013; 8:e53895.

Anexos

Anexo 1: Cebadores PCR.

GAPDH	Forward	5'- ATCAGCAATGCCTCCTGCAC -3'
	Reverse	5'- TGGCATGGACTGTGGTCATG -3'
REX1	Forward	5'- GAGCCCGGATCCTACTTTCCCT -3'
	Reverse	5'- ACATGACAGGCAAGAAGCTTC -3'
SOX1	Forward	5'- CAATGCGGGGAGGAGAAGTC -3'
	Reverse	5'- CTCTGGACCAAAGTGTGGCG -3'
PAX6	Forward	5'- AATAACCTGCCTATGCAACCC -3'
	Reverse	5'- AACTTGAAGTGGAACTGACACAC -3'
NESTIN	Forward	5'- GGCAGCGTTGGAACAGAGGT -3'
	Reverse	5'- CATCTTGAGGTGCGCCAGCT -3'

Anexo 2: Cebadores qPCR.

GAPDH	Forward	5'- ATCAGCAATGCCTCCTGCAC -3'
	Reverse	5'- TGGCATGGACTGTGGTCATG -3'
NESTIN	Forward	5'- GGCAGCGTTGGAACAGAGGT -3'
	Reverse	5'- CATCTTGAGGTGCGCCAGCT -3'
NESTIN Noisa	Forward	5'- GAGGGAAGTCTTGGAGCCAC -3'
	Reverse	5'- AAGATGTCCCTCAGCCTGG -3'

Anexo 3: Cebadores PCR previos a la pirosecuenciación.

Primera PCR		
HERV-W cromosoma 9	Forward externo	5'- AGTATTAGGTGGATTAGGTATTGG -3'
	Reverse externo	5'- TAACCATTTTTTTTCCCACA -3'

Segunda PCR		
HERV-W cromosoma 9	Forward interno	5'- AAGAATTAATGGTGATATGGAA -3'
	Reverse interno	[Biotina]- 5'- CAACATCAAACATAAACTAACAA -3'