

## Trabajo Fin de Máster

Estudio de los cambios epigenéticos en esclerosis múltiple: La metilación de los retrovirus endógenos humanos (HERV-W)

---

Study of epigenetic changes in Multiple Sclerosis:  
Methylation of human endogenous retroviruses  
(HERV-W)

Autor

María Martínez Santolaria

Directores

Jon Shoorlemmer  
Sofía Macías

Máster en Biología Molecular y Celular  
Facultad de Ciencias  
Universidad de Zaragoza

2016-2017





**Universidad**  
Zaragoza



D. Jon Schoorlemmer, investigador ARAID y Sofía Macías, estudiante de doctorado de la Universidad de Zaragoza

Hacen constar:

Que la alumna Dña. María Martínez Santolaria ha realizado bajo su dirección, en el IACS/Centro de Investigación Biomédica de Aragón, su Trabajo Fin de Máster titulado “Estudio de los cambios epigenéticos en esclerosis múltiple: La metilación de los retrovirus endógenos humanos (HERV-W)”, correspondiendo fielmente a los resultados obtenidos. Una vez redactada la memoria, ha sido revisada y se encuentra conforme para ser presentada en la Universidad de Zaragoza.

Y para que conste, expedimos el presente en Zaragoza a 12 de septiembre de 2017.

Fdo. Jon Schoorlemmer

Fdo. Sofía Macías



## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

---

<b>BMP</b>	<i>Bone Morphogenetic Protein</i> (Proteína morfogénica del hueso)
<b>CIS</b>	<i>Clinically Isolated Syndrome</i> (Síndrome clínico aislado)
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
<b>dNTPs</b>	Desoxinucleótidos
<b>EBs</b>	<i>Embryoid Bodies</i> (Cuerpos embrioides)
<b>EBV</b>	<i>Ebstein-Barr virus</i> (Virus Ebstein-Barr)
<b>EGF</b>	<i>Epidermal Growth Factor</i> (Factor de crecimiento epidérmico)
<b>EM</b>	Esclerosis Múltiple
<b>ERVWE-1</b>	<i>Endogenous Retrovirus group W member 1</i> (Miembro 1 del grupo W de retrovirus endógenos)
<b>ES cells</b>	<i>Embryonic Stem Cells</i> (Células madre embrionarias)
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>FGF2</b>	<i>Fibroblast Growth Factor 2</i> (Factor 2 de crecimiento fibroblástico)
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>FSC</b>	<i>Forward Side Chanel</i> (Detector frontal)
<b>g</b>	Fuerza centrífuga relativa
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehído 3- fosfato-deshidrogenasa
<b>gDNA</b>	DNA genómico
<b>h</b>	Horas
<b>HERVs</b>	<i>Human Endogenous Retroviruses</i> (Retrovirus endógenos humanos)
<b>hESCs</b>	<i>Human Embryonic Stem Cells</i> (Células madre humanas embrionarias)
<b>HHV6</b>	<i>Human Herpes Virus 6</i> (Virus humano del Herpes 6)
<b>IFN</b>	Interferón
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>iPSCs</b>	<i>Induced pluripotent stem cells</i> (Células madre pluripotentes inducidas).
<b>KLF4</b>	<i>Kruppel Like Factor 4</i>
<b>KSR</b>	<i>Knockout Serum Replacement</i>
<b>L1</b>	<i>LINE1 (long interspersed nuclear elements)</i>
<b>LN</b>	Laminina
<b>Lt-NES cells</b>	<i>Long term neuroepithelial stem cells</i>
<b>LTR</b>	<i>Long terminal repeats</i>
<b>MEFs</b>	<i>Mouse Embryonic Fibroblasts</i> (Fibroblastos embrionarios de ratón)
<b>MEFCM</b>	Medio condicionado de MEFs
<b>Mg</b>	Magnesio
<b>min</b>	Minutos
<b>ml</b>	Mililitros

<b>mM</b>	milimolar
<b>MQ</b>	Agua mili-Q
<b>MS</b>	<i>Multiple Sclerosis</i> (Esclerosis múltiple)
<b>MSRV</b>	<i>Multipe Sclerosis associated retrovirus</i> (Retrovirus asociado a esclerosis múltiple)
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sodio
<b>NEEA</b>	<i>Non-essential amino acids</i> (Aminoácidos no esenciales)
<b>ng</b>	nanogramos
<b>NSCs</b>	Neural Stem Cells (Células madre neuronales)
<b>OCT4</b>	<i>Octamer-binding transcription factor 4</i>
<b>ORF</b>	<i>Open Reading frames</i> (Marcos de lectura abiertos)
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBMCs</b>	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> (Células mononucleares de sangre periférica)
<b>PBS</b>	<i>Phosphate-buffered saline</i>
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PLO</b>	Poli-L-ornitina
<b>PPRS</b>	<i>Primary progressive Multiple Sclerosis</i> (Esclerosis múltiple primaria progresiva)
<b>P/S</b>	Penicilina con estreptomicina
<b>REX1</b>	<i>Reduced expression 1</i>
<b>RI</b>	<i>Rock Inhibitor</i>
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico)
<b>RRMS</b>	<i>Relapsing-Remiting Multiple Sclerosis</i> (Esclerosis múltiple de recaída remitente)
<b>s</b>	Segundos
<b>SFB</b>	Suero Fetal Bovino
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>SPMS</b>	<i>Secondary Progressive Multiple Sclerosis</i> (Esclerosis múltiple secundaria progresiva)
<b>SSEA</b>	<i>Stage-specific embryonic antigen</i> (Antígeno específico del estado embrionario)
<b>TE</b>	Solución Tris-EDTA
<b>Tm</b>	<i>Melting temperature</i> (Temperatura alineamiento de <i>primers</i> )
<b>TRA</b>	<i>Tumor reject Antigen</i> (Antígeno de rechazo tumoral)
<b>tRNA</b>	RNA de transferencia
<b>TS cells</b>	<i>Trophoblastic stem cells</i> (Células madre trofoblásticas)
<b>ZO1</b>	<i>Zonula occludens-1</i>
<b>µM</b>	Micromolar
<b>µg</b>	microgramos
<b>αNANOG</b>	Anticuerpo contra Nanog
<b>αOCT4</b>	Anticuerpo contra OCT4
<b>αSSEA4</b>	Anticuerpo contra SSEA4

# Índice

---

Resumen .....	1
Abstract .....	2
1. Introducción .....	3
1.1. Epigenética.....	3
1.2. Esclerosis múltiple (EM).....	3
1.3. Retrovirus endógenos humanos (HERVs) .....	6
1.4. Esclerosis múltiple y Retrovirus endógenos humanos .....	10
1.5. Modelos celulares para estudiar enfermedades .....	11
2. Hipótesis y objetivos .....	13
3. Materiales y métodos .....	14
3.1. Cultivos celulares .....	14
3.1.1. Línea celular ES [4] .....	14
3.1.1.1. Mantenimiento de la línea celular ES [4].....	14
3.1.1.2. Generación de precursores neuronales.....	15
3.1.1.2.1. Formación de cuerpos embrioides (EBs) .....	15
3.1.1.2.2. Formación de las rosetas .....	16
3.1.1.2.3. Obtención de los precursores neuronales It-NES .....	17
3.1.1.3. Línea celular TSB7 .....	18
3.1.1.3.1. Mantenimiento de la línea celular TSB7 .....	18
3.2. Ensayos de citometría de flujo .....	19
3.3. Estudio de expresión génica .....	20

3.3.1. Extracción de RNA.....	20
3.3.2. Retrotranscripción del RNA: Obtención del cDNA.....	20
3.3.3. Reacción en cadena de la polimerasa: PCR .....	21
3.4. Estudio de niveles de metilación .....	21
3.4.1. Extracción de DNA genómico con el buffer de lisis FG2 .....	21
3.4.2. Extracción de DNA genómico precipitando con etanol .....	22
3.4.3. Conversión con bisulfito .....	22
3.4.4. Reacción en cadena de la polimerasa: PCR .....	22
3.4.5. Secuenciación del material genético por pirosecuenciación .....	23
4. Resultados .....	24
4.1. Acondicionamiento de las células ES [4] .....	24
4.2. Puesta a punto del ensayo de citometría .....	29
4.3. Establecimiento de la línea de precursores neuronales.....	32
4.3.1. Formación de las rosetas .....	34
4.3.2. Selección de las rosetas .....	36
4.3.3. Obtención de las células It-NES .....	38
4.3.4. Seguimiento del protocolo de diferenciación.....	39
4.4. Niveles de metilación de HERV-W/MSRV en el cromosoma 19 .....	40
5. Discusión .....	42
5.1. Acondicionamiento de las células ES [4] .....	42
5.2. Puesta a punto del ensayo de citometría .....	43
5.3. Establecimiento de la línea de precursores neuronales.....	44
5.4. Niveles de metilación de HERV-W/MSRV .....	48

6.	Conclusiones .....	49
6.	Conclusions .....	50
	Bibliografía.....	51
A.	Anexos.....	54
	A.1. Primers utilizados en los ensayos de expresión .....	54
	A.2. Primers utilizados en los ensayos de metilación .....	54
	A.3. Origen del medio MEFCM.....	55

## RESUMEN

---

La esclerosis múltiple o EM es una enfermedad crónica inflamatoria desmielinizante. Entre los factores que se cree que participan en su etiología se encuentran los retrovirus endógenos humanos (HERVs), que son restos de retrovirus que infectaron la línea germinal y se integraron en el genoma humano. HERV-W/MSRV (*Multiple sclerosis associated retrovirus*) es el retrovirus más asociado a la enfermedad. La expresión de MSRV ENV está elevada en sangre y lesiones cerebrales de pacientes con esclerosis múltiple. Esta expresión puede estar controlada por los niveles de metilación del DNA, razón que motivó su análisis. La mayor parte de los estudios se han realizado en células mononucleares de sangre periférica. Sin embargo, la esclerosis múltiple afecta al sistema nervioso central, motivo por el que interesa obtener células como las neuronas para realizar los estudios en ellas.

La diferenciación de las células madre embrionarias humanas (hESCs) a través de un protocolo basado en cuerpos embrioides (EBs) permitió la obtención de los precursores neuronales Lt-NES (*long term neuroepithelial stem cells*). Durante la diferenciación, se observó un cambio morfológico en las células y la aparición de rosetas, indicadoras de la inducción neuronal. Se redujo la expresión de los marcadores de pluripotencia OCT4 y REX1, y se incrementó la de PAX6 y SOX1. Las células hESCs se trataron de adaptar a medio condicionado proveniente de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFCM). No se consiguió una adaptación completa a este medio, pero sí hasta el 75%, con un mantenimiento de la expresión de los marcadores de pluripotencia OCT4 y REX1. La hipermetilación de HERV-W/MSRV en los tipos celulares analizados (hESCs, EBs (D5), precursores neuronales (NSC) y neuronas dopaminérgicas) fue muy similar, con valores superiores al 80% a nivel global. Estudios que refuerzen los resultados obtenidos y busquen posibles diferencias bajo condiciones patológicas de la enfermedad serán interesantes en un futuro.

## ABSTRACT

---

Multiple Sclerosis (MS) is a chronic inflammatory demyelinating disease. The cause is still unknown, but one of the factors that seem to contribute to it are human endogenous retroviruses (HERVs). HERVs are remnants of some retroviruses that infected the germline and integrated into the human genome. Multiple sclerosis associated retrovirus (HERV-W/MSRV) has the strongest association with the disease. MSRV *ENV* expression is elevated in blood and brain lesions in people with MS. This expression can be regulated by DNA methylation, so its study results interesting. Most of the studies have been made in peripheral blood mononuclear cells. However, MS attacks the central nervous system. This was the reason to obtain cells like neurons to do the experiments.

Human embryonic stem cells (hESCs) were differentiated to long term neuroepithelial stem cells (lt-NES) using a protocol based on embryoid bodies (EBs). During the differentiation of the cells, a morphological change was observed and rosette structures were formed, indicating the neuronal induction. Also, pluripotency markers (OCT4 and REX1) reduced its expression and PAX6 and SOX1 increased it. HESCs were tried to adapt to mouse embryonic fibroblast conditioned media (MEFCM). A 75% of the commercial media was successfully replaced by MEFCM without losing cell viability and pluripotency markers' expression. Hypermethylation of HERV-W/MSRV was found in all the kind of cells analyzed (hESCs, EBs (D5), neural stem cells and dopaminergic neurons). Methylation levels were similar between them and higher than 80%. In the future, more studies who support our results and look for differences in pathological conditions would be interesting.

# 1. INTRODUCCIÓN

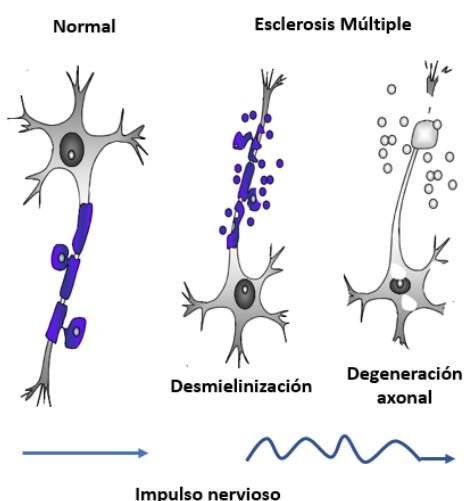
## 1.1. Epigenética

La epigenética engloba todos aquellos procesos y cambios, heredables y no heredables, que influyen en la regulación de la expresión génica, pero no modifican la secuencia subyacente de DNA. Existen diferentes mecanismos epigenéticos, entre los que se incluyen la remodelación de la estructura de la cromatina, el grado de metilación del DNA y la modificación de histonas. Los RNA no codificantes como los miRNA, lncRNAs o piRNAs también participan en este tipo de regulación (1,2).

La metilación del DNA es el mecanismo epigenético mejor caracterizado que se basa en la transferencia de un grupo metilo al carbono 5 de las citosinas de los dinucleótidos CpG. Es una modificación dinámica, que se encuentra regulada por una serie de enzimas entre las que destacan las DNA metiltransferasas (DNMTs). La metilación, especialmente en la zona del promotor, suele producir silenciamiento de genes, probablemente por el bloqueo de la unión de los factores de transcripción. La hipometilación se asocia con el efecto contrario. Cambios en el patrón de metilación pueden activar o reprimir genes que llevan al desarrollo de enfermedades, como el cáncer o la esclerosis múltiple (1).

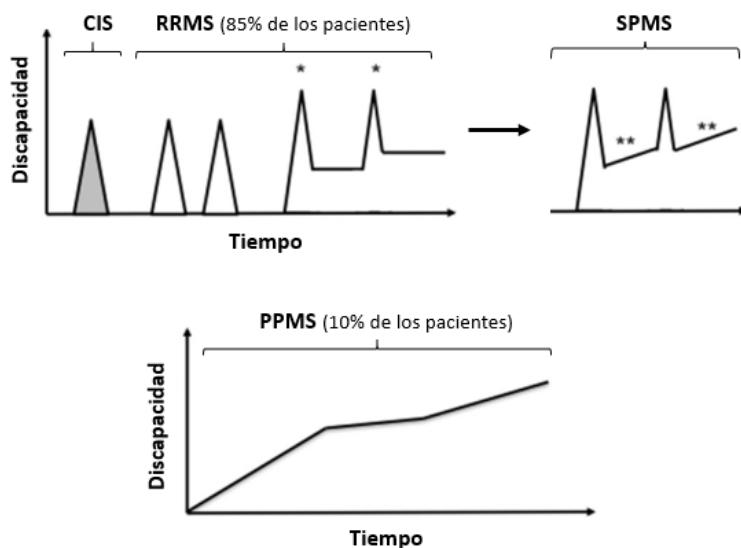
## 1.2. Esclerosis múltiple (EM)

La esclerosis múltiple o EM es una enfermedad inflamatoria neurodegenerativa crónica que afecta al sistema nervioso central (SNC) (1,3). Patológicamente, la enfermedad se caracteriza por una respuesta autoinmune, dominada por TH1 y TH17, con un incremento de IFN $\gamma$ , IL17, células T y macrófagos infiltrados. La mielina sintetizada por los oligodendrocitos es atacada, los axones de las neuronas se degeneran y la transmisión del impulso nervioso se ve afectada (Fig. 1.1) (1,4).



**Figura 1.1.- Patología en EM.** Representación del proceso de desmielinización y degeneración axonal característico en esclerosis múltiple, que afecta a la transmisión del impulso nervioso. Adaptación de Van der Star et al. 2012 (5).

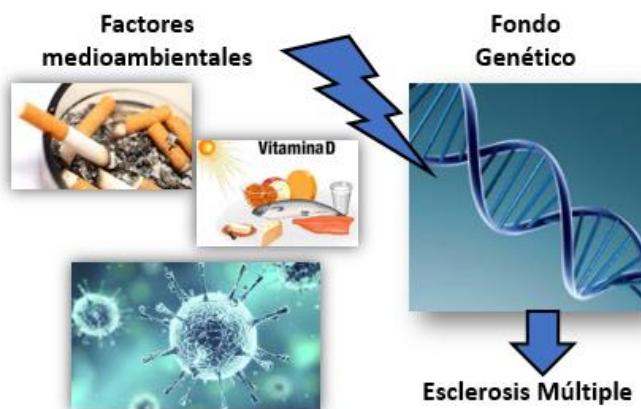
A nivel epidemiológico, la enfermedad presenta una mayor prevalencia en jóvenes, de entre 20 y 40 años, mujeres e individuos provenientes de América del Norte y Europa (6). Existen diferentes tipos de esclerosis múltiple según la aparición de los síntomas y su evolución (Fig 1.2). La mayoría de los afectados presenta la forma denominada RRMS (*Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis*). Cursan con brotes y remisiones sucesivas, de recuperación total o parcial (6). El brote es un concepto clínico que se define como la aparición o el empeoramiento de los síntomas de disfunción neurológica, con una duración mayor a 24 horas (7). Los pacientes experimentan alteraciones sensoriales asociadas a dolores neuropáticos, como parestesia, disestesia o diplopía. También pueden sufrir ataxia, vértigo, problemas urinarios y un característico entumecimiento, que suele comenzar en una de las extremidades inferiores, pudiendo alcanzar la zona del tórax y abdomen (4). Con el tiempo, algunos pacientes pueden adquirir un fenotipo progresivo de la enfermedad, SPMS (*Secondary Progressive Multiple Sclerosis*), donde los síntomas se agravan y no hay períodos de remisión. El grupo con peor pronóstico a nivel de tratamiento es PPRS (*Primary Progressive Multiple Sclerosis*), donde, desde el comienzo, la clínica se agrava progresivamente (4,6). En los últimos años ha surgido el grupo CIS (*Clinically Isolated Syndrome*), que se utiliza para definir las primeras manifestaciones de la enfermedad que no están precedidas por ningún evento neurológico (6). Muchos de los estudios realizados actualmente se centran en este grupo, al comenzar con los indicios de la esclerosis múltiple y su tratamiento.



**Figura 1.2.-Fenotipos de la esclerosis múltiple según la progresión de la discapacidad en el tiempo.**  
CIS (*Clinically Isolated Síndrome*), RRMS (*Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis*), SPMS (*Secondary Progressive Multiple Sclerosis*), PPMS (*Primary Progressive Multiple Sclerosis*). Los asteriscos representan la ausencia de recuperación total. Imagen adaptada de Montalbán 2017 et. al (6).

Actualmente, la mayor parte de las terapias aprobadas, como la tradicional basada en IFN $\beta$  o las que emplean anticuerpos monoclonales como Natalizumab, se centran en reducir la frecuencia y gravedad de los brotes, enlentecer la progresión de la enfermedad y mejorar las condiciones de vida del paciente (4,6,8). Hoy en día, no existe cura y su descubrimiento resulta complicado al desconocer con claridad cuál es el origen de la enfermedad.

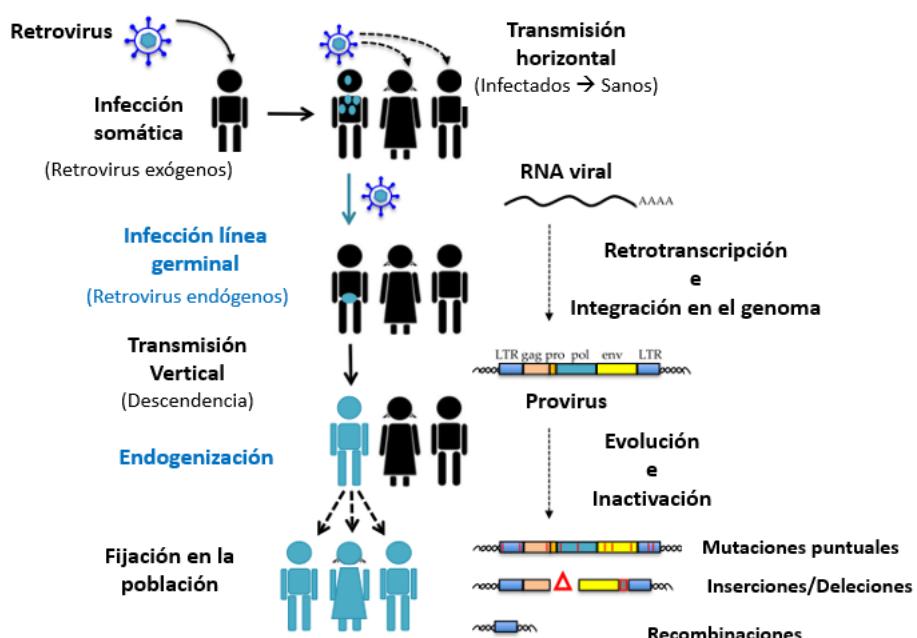
Se cree que la esclerosis múltiple tiene una etiología multifactorial, resultado de la interacción de factores medioambientales y genéticos (Fig 1.3) (8). La influencia del entorno activaría la predisposición genética del individuo, desencadenando el proceso inflamatorio. Respecto al componente genético, el *locus HLA*, donde se encuentran genes implicados en el correcto funcionamiento del sistema inmune, es el más asociado a la enfermedad. Otros genes relacionados encontrados en estudios GWAS (*Genome-Wide Association Study*) son los que codifican los receptores de IL2 e IL17, las moléculas co-estimuladoras CD40 ó CD80 o moléculas relacionadas con el metabolismo de la vitamina D o fármacos, entre otros (1). En cuanto a los factores ambientales, se ha ligado a esclerosis múltiple la vitamina D, el tabaquismo y ciertos agentes virales, entre los que destacan Epstein-Barr Virus (EBV), Human Herpes Virus 6 (HHV6) y los retrovirus endógenos humanos (HERVs) (9).



**Figura 1.3.- Etiología de la esclerosis múltiple.** Representación de los diferentes factores que se han asociado con el origen de la esclerosis múltiple. Factores medioambientales como el tabaquismo, la vitamina D o los virus, estimulan la predisposición del individuo, dada por su fondo genético, a sufrir esclerosis múltiple.

### 1.3. Retrovirus endógenos humanos (HERVs)

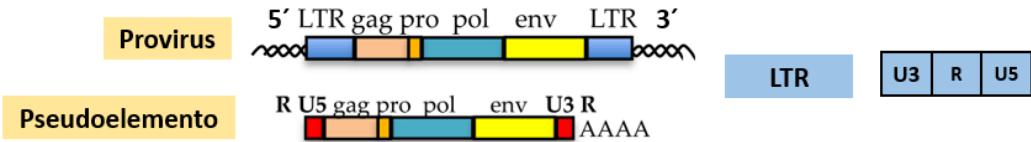
Los retrovirus son un tipo de virus encapsulados cuyo genoma es una hebra única positiva de RNA (3). Este RNA viral se replica usando la maquinaria del individuo para lo que necesita retrotranscribirse y formar una doble hebra de DNA, denominada provirus, que se integra en el genoma de la célula huésped por recombinación. Normalmente, las células somáticas son las dianas de los retrovirus, trasmitiéndose horizontalmente entre individuos infectados y sanos (10). Millones de años atrás, algunos de estos retrovirus lograron infectar células germinales, integrándose en su genoma, dando lugar a lo que se conoce actualmente como retrovirus endógenos humanos o HERVs (*Human endogenous retroviruses*) (3). Las secuencias integradas se transmitieron a la descendencia de forma vertical, estando presentes en todas las células del individuo (10) (Fig. 1.4).



**Figura 1.4.- Endogenización de los retrovirus endógenos humanos (HERVs).** Ver texto para más detalles. Imagen adaptada de Grandi et al. 2017 (10).

A lo largo de la evolución, los HERVs se han ido multiplicando y acumulando mutaciones, delecciones y recombinaciones que han acabado inactivando a la mayoría de ellos. Esto ha facilitado su mantenimiento o fijación en la población al no suponer un riesgo (Fig. 1.4) (10,11).

Los HERVs presentan una estructura típica retroviral (Fig 1.5). Dos secuencias repetitivas LTR (*Long Terminal Repeat*) flanquean los genes que codificarían las principales proteínas víricas: *gag* (matriz y núcleo), *pro* (proteasa), *pol* (transcriptasa inversa e integrasa) y *env* (envuelta) (3).



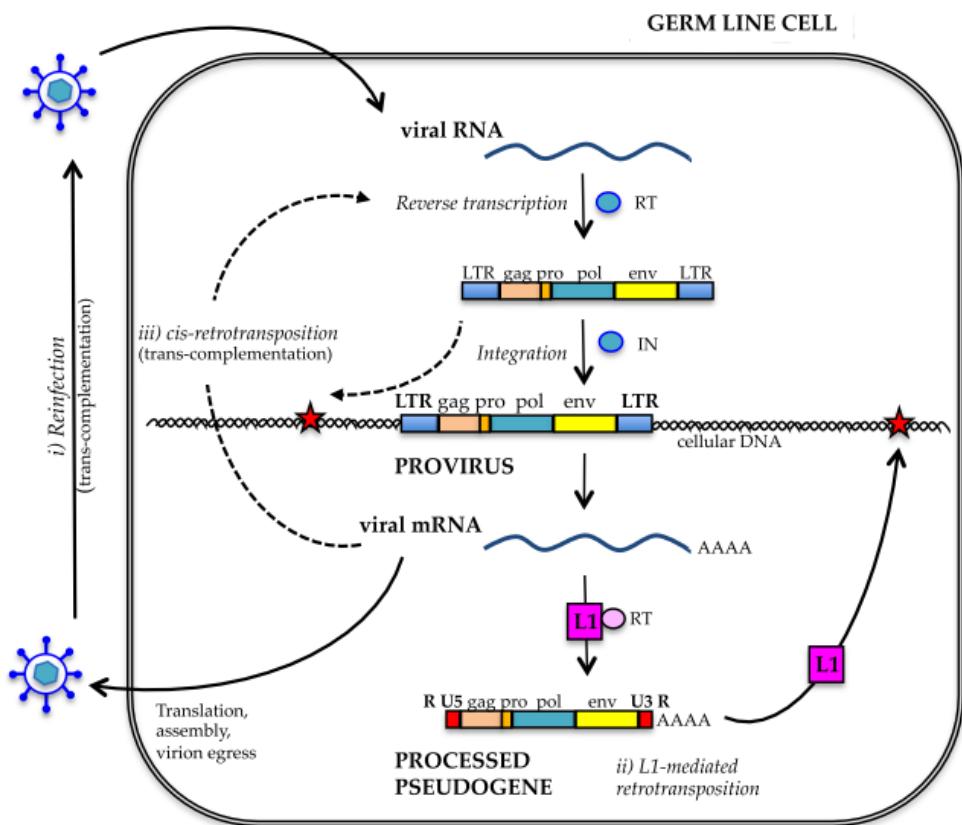
**Figura 1.5.- Estructura típica de un provirus, pseudoelemento y LTR.** Los provirus son las secuencias de cDNA que se forman tras la retrotranscripción del RNA viral. Estos provirus tienen una estructura típica retroviral, 2 LTR que flanquean los genes virales *gag*, *pro*, *pol* y *env*. En ocasiones, estos provirus se procesan, pierden secuencias y dan lugar a los pseudoelementos. Las LTR están constituidas normalmente por 3 componentes, U3, R y U5. Adaptación de Grandi et al. 2017 (10).

Los retrovirus endógenos pertenecen al grupo de elementos transponibles y se encuentran insertados tanto en regiones génicas, como intergénicas (12), constituyendo un 8% del genoma humano (3,9,13). Basándose en la similitud de su secuencia con los retrovirus exógenos, los HERVs se clasifican en 3 grandes clases y estas, a su vez, se dividen en una serie de familias, según el RNA de transferencia (tRNA) que se une al sitio de inicio de la transcripción (Tabla 1.1). Así, en HERV-W, la W indica que se une un triptófano (10). Actualmente existen 31 familias, algunas de las cuales están asociadas a enfermedades neurológicas, como es el caso de HERV-W (14).

Clase	Subfamilia Retroviridae	Ejemplos de HERVs
Clase I	Gammaretroviridae	HERV-H HERV-F <b>HERV-W</b>
Clase II	Betaretroviridae	HERV-P HERV-E HERV-T HERV-I HERV-K
Clase III	Spumaviridae	HERV-L HERV-S HERV-U

**Tabla 1.1.- Clasificación de algunos de los retrovirus endógenos humanos.** Adaptación de Colmegna et al. 2006 (15).

HERV-W pudo colonizar el genoma humano, distribuyendo sus copias entre los diferentes cromosomas por mecanismos como la cis-retrotransposición y reinfección (Fig 1.6). Además, a diferencia de otras familias, en HERV-W existen, a parte de los provirus, un 25% de pseudoelementos. Estos elementos se formaron por retrotransposición de provirus. En dicho proceso, se copia y se inserta la secuencia en otra posición genética a través de un intermediario de RNA mensajero, usando la maquinaria del elemento transponible LINE-1 (L1) (Fig 1.6) (10,12).



**Figura 1.6.- Mecanismos de colonización del genoma humano por HERV-W.** HERV-W pudo distribuir sus copias en los diferentes cromosomas a través de la retrotransposición, copia e inserción, mediada por la maquinaria del elemento transponible LINE 1 (L1), la reinfección o la cis-transposición. En estos dos últimos mecanismos, se necesitaría la ayuda de otros virus, al haber acumulado los retrovirus endógenos con el tiempo mutaciones que afectaron a su capacidad codificante. Imagen de Grandi et al. 2017 (10).

Normalmente, los HERVs se encuentran silenciados o tienen un nivel de expresión muy bajo. Algunos de ellos mantienen marcos de lectura abiertos (ORFs) que permiten la codificación de ciertos componentes virales, como la envuelta (*env*), muchas veces implicados en procesos patológicos (Tabla 1.2) (3,14). La expresión de los retrovirus endógenos está controlada, entre otros factores, por mecanismos epigenéticos. Destaca la metilación del DNA, especialmente en las secuencias LTR, al actuar estas regiones como promotores y dirigir la expresión específica según el tipo celular (12).

Los retrovirus endógenos humanos, suelen estar hipermetilados en la zona del promotor y regiones codificantes, lo que produce el silenciamiento de su expresión (16). No obstante, en ciertas condiciones fisiológicas y tipos celulares, se produce un cambio de metilación, que incrementa la transcripción. Este es el caso de ERVWE1, un miembro de HERV-W, que tiene las secuencias 5'LTR hipometiladas en determinados tipos celulares de placenta, lo que permite la expresión de la proteína SYNCYTIN-1, implicada en el correcto desarrollo de la misma (17). Otros casos donde se produce una desregulación de la metilación son las enfermedades autoinmunes, como la esclerosis múltiple (1), y tumores (18).

En estas situaciones, lo que se observa es una hipometilación, que favorece la expresión y detección de transcritos de HERVs. Es decir, que la hipometilación permitiría la expresión de HERVs (1).

HERV	ORFs	Notas
<b>HERV-K</b>	Gag, Pol, Env	HERV-K18 env (K18.3) está asociado con esclerosis múltiple (MS).
<b>HERV-H/F</b>	Gag, Pol, Env	Polimorfismos (SNPs) en HERV-Fc1 del cromosoma X están ligados a MS.
<b>HERV-W</b>	Env	El gen env del locus ERVW-1 codifica para syncytin-1. Asociado a MS.
<b>HERV-W/MSRV</b>	Env, Gag	Número de copias y niveles de expresión relacionados con MS.
HERV-R	Env	
HERV-P	Env	
HERV-T	Env	

**Tabla 1.2.- Marcos de lectura abiertos (ORFs) codificantes de los retrovirus endógenos humanos.**

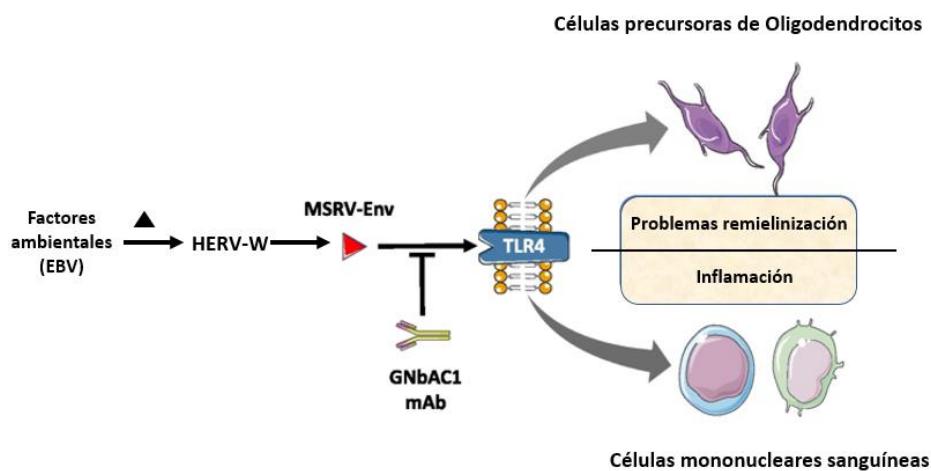
Recopilación de algunos de los ORFs más importantes, anotados como Pol, Gag y Env. Env es el más común. Estos ORFs se pueden encontrar en más de un *locus*. En negrita se muestran las familias de HERVs que se han asociado a esclerosis múltiple. MSRV (*Multiple Sclerosis-associated retrovirus*) Imagen adaptada de Christensen et al. 2016 (14).

En ocasiones, los retrovirus son utilizados beneficiosamente por el hospedador, como el caso de SYNCYTIN1, necesario para el correcto desarrollo del embarazo (19). Sin embargo, la mayoría de las veces, los HERVs contribuyen al desarrollo de enfermedades como la esquizofrenia, el cáncer o la esclerosis múltiple (14,20).

## 1.4. Esclerosis múltiple y Retrovirus endógenos humanos

Tres familias de retrovirus endógenos humanos se han relacionado con EM: HERV-K, HERV-H y HERV-W (3,9). Entre ellas, HERV-W es la que presenta la asociación más fuerte a través de HERV-W/MSRV, al ser el primer retrovirus endógeno con diferencias significativas entre pacientes de EM e individuos sanos (3,9,21). El número de copias de MSRV ENV en pacientes con EM es mucho mayor en comparación con los controles (20,22). Por otro lado, se han encontrado, tanto a nivel de proteína como de RNA, unos valores muy elevados de MSRV ENV en células mononucleares de sangre periférica, líquido cefalorraquídeo y lesiones cerebrales de pacientes de EM. Además, la presencia de estas proteínas en los enfermos se ha relacionado con una peor pronóstico (3,9,20). Cuando los enfermos de EM se someten a diferentes tratamientos como IFN $\beta$  o Natalizumab, la expresión de MSRV ENV se reduce. Todo ello indica la importancia de MSRV ENV en esclerosis múltiple y como la evaluación de sus niveles plasmáticos podría ser un buen medio para monitorizar el progreso de la enfermedad y la efectividad de los tratamientos (20).

El aumento de la expresión de HERV-W/MSRV se cree que estimula el ambiente inflamatorio de la EM a través del siguiente mecanismo. MSRV ENV interaccionaría con el receptor TLR4 (*Toll-like receptor 4*) y estimularía a factores proinflamatorios como los grupos de nitrotyrosina. A su vez, estos factores bloquearían la diferenciación de los precursores de oligodendrocitos, afectando a la expresión de la mielina (10). Esta interacción favorecería a su vez la síntesis y secreción de citoquinas proinflamatorias como IL1, IL6 y TNF $\alpha$  (*Tumoral necrosis factor*), que estimularían la liberación de MSRV ENV, produciendo una retroalimentación positiva que amplificaría la patogenia de la enfermedad (Fig. 1.7) (9).

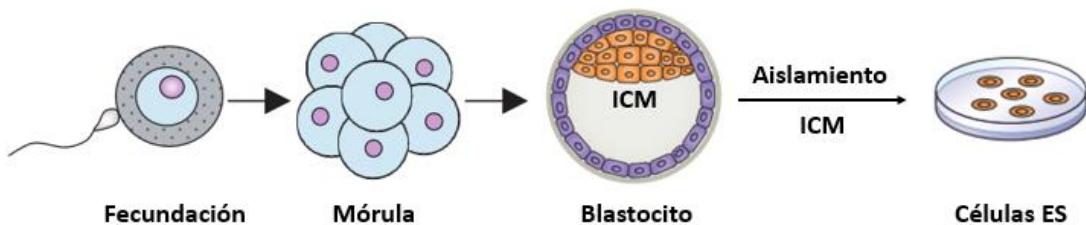


**Figura 1.7.- Posible mecanismo de acción de MSRV ENV en la patogenia de la enfermedad.** Factores ambientales como el virus Ebstein-Barr (EBV) activarán la expresión de HERV-W/MSRV, produciendo MSRV ENV. Su interacción con el receptor TLR4 (*Toll-Like receptor 4*) generaría problemas de mielinización e inflamación. Se están desarrollando nuevos tratamientos con anticuerpos monoclonales (GNbAC1) que bloqueen esa interacción. Imagen adaptada de Madeira et al 2016 (23).

## 1.5. Modelos celulares para estudiar enfermedades

En esclerosis múltiple no existe un único modelo, a nivel celular o animal, completamente bueno. Esto se debe a que es una enfermedad multifactorial difícil de abarcar. Dentro de los modelos *in vitro*, destaca el cultivo de células del SNC como la microglía, las neuronas, los oligodendrocitos, los astrocitos o bien, co-cultivos de varios tipos celulares. Cabe mencionar que el cerebro humano es diferente al del ratón, motivo por el que se prefiere trabajar con modelos humanos cuando es posible. El aislamiento de las células del SNC y su mantenimiento en cultivo es limitado y complicado (24). Así, las células troncales embrionarias humanas, más comúnmente conocidas como células madre embrionarias humanas (hESCs) son una gran herramienta para generar modelos que permitan analizar el mecanismo molecular de la enfermedad, probar fármacos en desarrollo o usarse en terapias de reemplazo celular, entre otros (25,26).

Las hESCs, que provienen de la masa celular interna del blastocito (Fig.1.8), presentan dos propiedades fundamentales. Por un lado, proliferan indefinidamente *in vitro*, conservando su identidad, lo que se denomina como auto-renovación o *self-renewal* (27). El factor de crecimiento FGF2 (*Fibroblast Growth Factor*) tiene un papel clave al favorecer su supervivencia sin diferenciarse, motivo por el que se suele añadir a los cultivos de forma exógena (28). Por otro lado, son pluripotentes, es decir, son capaces de generar cualquier tipo celular que pertenezca a las 3 capas embrionarias (endodermo, ectodermo y mesodermo) (27). Existe una serie de marcadores característicos de las células ES que están asociados a pluripotencia. Este es el caso de los factores de transcripción OCT4 (*octamer-binding transcription factor 4*) y REX1 (*Reduced expression 1*). Tanto OCT4, también conocido como POU5F1, como REX1, también llamado ZFP42 (*Zinc finger protein 42*), forman parte de la red transcripcional encargada del control de la pluripotencia y el mantenimiento de la identidad de las células ES (29,30). Las células hES también presentan una serie de antígenos de superficie que permiten su diferenciación respecto a las células de origen murino. Destacan el glucoesfingolípido SSEA4 (*Stage-specific embryonic antigen-4*) y el proteoglicano TRA-1-60 (*Tumor reject antigen*) (25).



**Figura 1.8.- Origen de las células madre embrionarias.** Las células ES vienen del aislamiento y cultivo de las células de la masa celular interna (ICM) del blastocito. Representación de los diferentes estadios hasta su obtención.

En los últimos años, los protocolos de diferenciación de las células hES se han ido mejorando, incrementando la pureza de las poblaciones obtenidas (25). En la diferenciación a células del sistema nervioso central el primer paso es la inducción neuronal, la especificación irreversible del neuroepitelio a partir del ectodermo (31). Se han descrito numerosas aproximaciones para conseguir esta inducción. La más tradicional se centra en la formación de cuerpos embrioides (EBs) (32,33), que son agregados tridimensionales de células pluripotentes que son capaces de mimetizar el desarrollo embrionario (34). Otra posibilidad es su co-cultivo con células estromales o astrocitos embrionarios, que estimulan el cambio al fenotipo neuronal (35). Finalmente, la que más se suele utilizar en los últimos años se basa en el cultivo de las células hES en monocapa y ausencia de células alimentadoras o *feeders*, que normalmente son fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs), suplementando al medio factores que inducen la diferenciación (36). Los factores de diferenciación más usados son Noggin y SB431542, que inhiben la ruta de señalización de SMAD y potencian la inducción neuronal, que permite obtener, más rápido, células positivas para una serie de marcadores característicos (37). Existen diferentes marcadores y cambios morfológicos que permiten controlar y seguir el proceso de diferenciación neuronal. Para los precursores neuronales se emplean factores de transcripción como SOX1 y PAX6, y la proteína de filamento intermedio NESTIN, entre otros (33). Morfológicamente se forman las denominadas rosetas, que recuerdan a una sección del tubo neural (38).

El medio que se emplea en el cultivo de los precursores neuronales obtenidos es importante para mantener el fenotipo neuronal, y, por tanto, conseguir una buena diferenciación. Como medio base se suele usar DMEM/F12 o medio Neurobasal, que es un derivado del anterior. Uno de los suplementos clave que se suele añadir es N2. Entre sus componentes se encuentra la insulina, que podría actuar a través de los receptores de crecimiento correspondientes estimulando la proliferación y diferenciación celular. Otro de los suplementos es B27, que aumenta la supervivencia de las células y su multiplicación. Los precursores neuronales se suelen mantener con una serie de factores de crecimiento, como FGF2 y EFG (*Epidermal growth factor*), que se renuevan diariamente para evitar la diferenciación (32,33,39). La generación de poblaciones neuronales a partir de estos precursores se suele conseguir retirando los factores de crecimiento y cambiando la composición de los medios de cultivo (38).

Gracias a la diferenciación de las células madre se pueden conseguir tipos celulares como las neuronas con una disponibilidad mayor a si se obtuvieran de biopsias. La tendencia en los últimos años a cumplir la regla de las 3 “Rs” (Reducir, Reciclar y Reutilizar) ha potenciado también considerablemente su uso (26). En el futuro, el desarrollo de las iPSCs (*Induced pluripotent stem cells*) a partir de células del paciente se presenta prometedor. En el caso de la esclerosis múltiple, ya se han generado este tipo de células y se han diferenciado satisfactoriamente, consiguiendo neuronas (39). Disponer de este tipo de modelos permitirá incrementar los estudios y el conocimiento que se tiene acerca de la enfermedad, pudiendo esclarecer muchas de las incógnitas que siguen vigentes.

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

Hasta ahora, muchos de los estudios que relacionan a HERV-W/MSRV con esclerosis múltiple se han realizado en células mononucleares de sangre periférica, al ser más accesibles que otras muestras (40–42). No obstante, la esclerosis múltiple es una enfermedad que afecta al SNC (3). Por lo tanto, es relevante desarrollar modelos de estudio del mismo. El uso de células hES e iPS de pacientes aporta una oportunidad para generar dichos modelos. Como primer paso en esta dirección, se planteó investigar una población del SNC, las neuronas. Por ese motivo, se trató de establecer una línea de precursores neuronales (lt-NES) a partir de hESCs.

Actualmente, sigue sin esclarecerse si los retrovirus endógenos son la causa o el efecto de la pérdida de la regulación del sistema inmune en esclerosis múltiple (3). Lo que sí que se sabe es que hay unos niveles más elevados de HERV-W/MSRV en pacientes de EM (43–45). Dado que los niveles de expresión de los retrovirus endógenos pueden estar regulados por los niveles de metilación (1,11), se quiso estudiar esta modificación epigenética en poblaciones derivadas de hESCs y neuronas.

Los **objetivos** que se desarrollaron en este trabajo se exponen a continuación.

- I. Acondicionar las células troncales embrionarias (hESCs) a un medio condicionado de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFCM).
  
- II. Implementar un protocolo de diferenciación para obtener precursores neuronales lt-NES (*long term neuroepithelial stem cells*) a partir de hESCs.
  
- III. Analizar el grado de metilación de HERV-W/MSRV en hESCs, poblaciones celulares derivadas de hESCs y neuronas.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 3.1. Cultivos celulares

Para el cultivo celular se usaron incubadores a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 3.1.1. Línea celular ES [4]

---

Las hESCs empleadas vienen de la línea celular ES [4], originada por el Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona (CMR [B]) y disponible en el Banco Nacional de Líneas Celulares. Dichas células fueron obtenidas de un embrión humano criopreservado en el día +2 de su desarrollo.

##### 3.1.1.1. Mantenimiento de la línea celular ES [4]

La línea celular ES [4] se cultivó sobre Matrigel (Thermo Fisher) y se mantuvo en el medio mTeSR™1 (STEMCELL Technologies). El medio se renovó diariamente, tal y como indican los protocolos, para aportar los nutrientes y factores necesarios para el crecimiento y supervivencia celular.

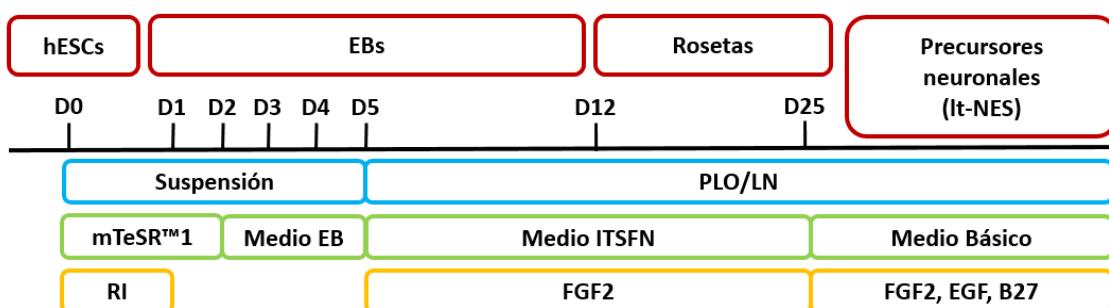
La descongelación se realizó en un baño de agua a 37°C. El vial de células se pasó a un falcon de 15 ml, donde se añadió, gota a gota, 4 ml de medio mTeSR™1, para diluir el DMSO y minimizar el choque osmótico. Las células se centrifugaron y resuspendieron en medio mTeSR™1 enriquecido con Thiazovivin (Sigma-Aldrich, 2 µM). Thiazovivin, a partir de ahora denominado como *Rock Inhibitor* (RI), es un inhibidor de la quinasa Rho que potencia la supervivencia de células criopreservadas (46,47).

Cuando las colonias celulares alcanzaron el tamaño apropiado, se pasaron con la proporción que se consideró apropiada (1:4-1:8). Para ello se utilizó el reactivo ReLeSR™ (STEMCELL Technologies), un compuesto libre de enzima que disocia a las células formando agregados, favoreciendo así la supervivencia celular. Para pasar las células, se lavó el pocillo dos veces con PBS, se añadió el volumen correspondiente de ReLeSR™ y se incubó, 2 minutos a 37°C y, tras eliminar el sobrenadante, otros 2 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, se añadió medio fresco, se levantaron las colonias con un rascador y se disgregaron con cuidado usando una pipeta de 5 ml.

La criopreservación de las células se realizó una vez alcanzando aproximadamente el 80% de confluencia, para incrementar la supervivencia tras la descongelación. Brevemente, las colonias se levantaron usando ReLeSR™, se centrifugaron 3 minutos a 200 g y se resuspendieron en el medio de criopreservación (90% de Suero fetal bovino (SFB) y 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO)). Las células estuvieron a -80°C en un *frosty* toda la noche para conseguir su congelación gradual y ser guardadas finalmente en nitrógeno líquido.

### 3.1.2. Generación de precursores neuronales

El protocolo que se siguió para la obtención de precursores neuronales se basó en Koch et al. 2009 (32), con ciertas modificaciones (Fig. 3.1). El protocolo constó de una serie de etapas principales. En el primer estadio, se formaron los EBs a partir de las células hESCs y se mantuvieron en suspensión durante 4 días. En la segunda etapa, los EBs se plaquearon en una superficie de Poli-L-ornitina con Laminina (PLO/LN). Tras una semana en cultivo, aparecieron unas estructuras denominadas rosetas, que se aislaron mecánica o enzimáticamente, para ser finalmente sembradas y propagadas como células It-NES (*long term neuroepithelial stem cells*).



**Figura 3.1.- Esquema del protocolo de diferenciación de las células madre embrionarias humanas (hESCs) a precursores neuronales (It-NES).** Representación de los distintos tipos celulares (rojo), días en cultivo (negro), medios de cultivo (verde) y factores o suplementos (amarillo) en cada etapa del protocolo. También se indica el soporte del cultivo (azul). Abreviaturas: RI (Rock Inhibitor), FGF2 (Fibroblast Growth Factor 2), EGF (Epidermal growth factor). La composición de los medios se encuentra detallada en los subapartados 3.1.2.

#### 3.1.2.1. Formación de cuerpos embrioides (EBs)

Los EBs se generaron siguiendo dos protocolos propuestos por Stover et al. 2011 (48), con pequeñas modificaciones. Ambos métodos pretenden levantar las células de la placa de cultivo para mantenerlas en suspensión y formar los cuerpos.

Uno de los protocolos consistió en la obtención de EBs a través de la formación de clústeres de células, para lo que se empleó el reactivo ReLeSR™ y se siguió el protocolo utilizado en el mantenimiento de las células ES [4] expuesto en el apartado 3.1.1.1.

El otro método se basó en la formación de EBs a partir de células individuales (*single cells*), en cuyo caso se empleó Acutasa. La Acutasa es una solución de enzimas proteolíticas y collagenolíticas que sirve para levantar las células de la placa de cultivo y hacerlas al mismo tiempo *single cells*. Brevemente, las células se lavaron dos veces con PBS, se añadió el volumen de Acutasa correspondiente y se incubó 4 minutos a 37°C. Posteriormente, se diluyó la Acutasa en PBS y se centrifugaron las células 3 minutos a 200 g.

Finalmente, se resuspendió el *pellet* de células en medio mTeSR™1 enriquecido con una concentración final de 2 µM de RI. Esta molécula favorece la supervivencia de las células disociadas, aumentando la eficiencia de la formación de EBs (46,49).

Las células levantadas se mantuvieron en suspensión usando placas Petri de superficie no adherente. El medio se renovó diariamente, decantando los EBs y aspirando el sobrenadante. En el día 1 se continuó usando el medio mTeSR™1 para recuperar a las células y conseguir que los EBs se formaran correctamente (50). En el día 2 se produjo el cambio al medio EB (Tabla 3.1). Los cuerpos estuvieron en este medio hasta que se decidieron sembrar o analizar, normalmente en el día 5 (D5).

Componente	Concentración final	Proveedor
<b>DMEM/F12</b>		Thermo Fisher
<b>Glutamax</b>	1X	Thermo Fisher
<b>NEEA</b>	1X	Sigma-Aldrich
<b>2-mercaptopetanol</b>	50 µM	Sigma-Aldrich
<b>Knock out serum replacement (KSR)</b>	10%	Thermo Fisher
<b>Penicilina y estreptomicina (P/S)</b>	1X	Sigma-Aldrich

Tabla 3.1.- Composición del medio EB.

### 3.1.2.2. Formación de las rosetas

Los EBs de 5 días se sembraron en una placa previamente tratada con Poli-L-ornitina (Sigma-Aldrich, 0,1 mg/ml) y Laminina (Sigma-Aldrich, 10 µg/ml). A partir de ese momento se usó un medio de inducción neuronal, medio ITSFN (Tabla 3.2), suplementado con 10 ng/ml de FGF2. El medio se renovó diariamente hasta la selección de las rosetas, entre una y dos semanas tras la siembra de los EBs.

Componente	Concentración final	Proveedor
<b>DMEM/F12</b>		Thermo Fisher
<b>Insulina</b>	25 µg/ml	Sigma-Aldrich
<b>Transferrina</b>	100 µg/ml	Sigma-Aldrich
<b>Selenito de Sodio</b>	5 ng/ml	Sigma-Aldrich
<b>Fibronectina</b>	2,5 µg/ml	MP Biomedicals

Tabla 3.2.- Composición del medio ITSFN. El nombre se corresponde a las siglas de los componentes que lo forman: Insulina, Transferrina, Selenito de Sodio y Fibronectina.

### 3.1.2.3. Obtención de los precursores neuronales It-NES

Con ayuda de un microscopio, se indicó con una marca en el exterior de la placa los EBs que generaron rosetas. Las rosetas se seleccionaron mecánicamente, a través del uso de una punta de micropipeta P200, o con el reactivo *STEMdiff™ Neural Rosette Selection Reagent* de STEMCELL Technologies, siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se lavó con DMEM/F12, se añadió el reactivo y se incubó 1 hora a 37°C. Posteriormente, se retiró el reactivo aspirando con cuidado, se añadió DMEM/F12 y se levantaron las rosetas impulsando el medio con fuerza sobre cada uno de los cuerpos que se habían marcado previamente.

Tras levantar las rosetas, se sembraron a gran densidad en una placa previamente tratada con PLO/LN. Las células adheridas se mantuvieron con el medio denominado medio Básico, que se suplementó diariamente con una serie de factores y suplementos (Tabla 3.2).

Componente	Concentración final	Proveedor
<b>DMEM/F12</b>		Thermo Fisher
<b>Glutamax</b>	1X	Thermo Fisher
<b>Glucosa</b>	1,6 g/ml	Sigma-Aldrich
<b>Suplemento N<sub>2</sub></b>	1X	Thermo Fisher
<b>Penicilina y estreptomicina (P/S)</b>	1X	Sigma-Aldrich
<b>Factores y suplementos</b>		
<b>FGF2</b>	10 ng/ml	Peprotech
<b>EGF</b>	10 ng/ml	STEMCELL Technologies
<b>B27</b>	1 µl/ml	Thermo Fisher

Tabla 3.3.- Composición del medio Básico.

Para mantener las células, el medio se renovó diariamente y se añadieron los factores de crecimiento frescos. Estos factores permitieron mantener el estado desdiferenciado de las células.

Las células se pasaron con Acutasa cuando estuvieron confluentes, con una proporción 1:2 ó 1:4. Brevemente, se lavaron con DMEM/F12, se añadió el volumen correspondiente de Acutasa y se incubó unos 5 min a 37°C. La Acutasa se diluyó en DMEM/F12, se centrifugaron las células 5 min a 300 g y se resuspendió el *pellet* en medio Básico.

La criopreservación de las células se realizó cuando alcanzaron la confluencia. Las células se levantaron usando Acutasa, se centrifugaron 5 min a 300 g, se aspiró el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* de células en el medio de criopreservación (90% de SFB y 10% de DMSO). Posteriormente se siguieron los mismos pasos que en el apartado 3.1.1.1.

### 3.1.3. Línea celular TSB7

---

Las células trofoblásticas (TS, *trophoblast stem*) de ratón que se utilizaron provienen de la línea celular B7 (51).

#### 3.1.3.1. Mantenimiento de la línea celular TSB7

El mantenimiento de las células TSB7 se realizó siguiendo las indicaciones de Tanaka et al. 2006 (52), con algunas modificaciones. Se utilizaron placas de cultivo tratadas previamente con gelatina (Sigma-Aldrich, 1%). Las células se mantuvieron en el medio 70 TS-CM (70% medio condicionado TS y 30% medio TS Básico) (Tabla 3.4)). Dicho medio se renovó y suplementó diariamente con FGF2 (25 ng/ml) y Heparina (Sigma-Aldrich, 1 mg/ml). Estos factores son claves para mantener a las células sin diferenciarse.

Medio TS Básico		
Componente	Concentración final	Proveedor
<b>RPMI 1640</b>		Thermo Fisher
<b>Suero Fetal Bovino</b> (Gibco 41Q7385K)	20 %	Thermo Fisher
<b>B-mercptoetanol</b>	100 µM	Sigma-Aldrich
<b>Glutamax</b>	1X	Sigma-Aldrich
<b>Piruvato</b>	1 mM	Sigma-Aldrich

**Tabla 3.4.- Composición del medio TS Básico.**

La descongelación se realizó en un baño de agua a 37°C. El DMSO se diluyó con medio TS Básico caliente. Las células se centrifugaron 5 min a 300 g y se resuspendieron en el medio 70 TS-CM, con la adición de los factores correspondientes.

Cuando las células alcanzaron una confluencia del 80%, se pasaron con la proporción que se consideró apropiada. Brevemente, se lavó dos veces con PBS, se añadió el volumen correspondiente de tripsina (Sigma-Aldrich, 0,25%) y se incubó a 37°C durante unos 4 min. La tripsina se diluyó con medio TS Básico caliente, se pipetaron las células para soltarlas de la placa y se centrifugó 5 min a 300 g. El *pellet* de células se resuspendió finalmente en el medio 70 TS-CM, añadiendo los factores FGF2 y Heparina.

Las células se criopreservaron al llegar al 80% de confluencia. Se levantaron, se centrifugaron y se resuspendieron en el medio de criopreservación (90% de SFB y 10% de DMSO). El lote de SFB (Gibco 41Q7385K) se había seleccionado previamente, asegurando su óptimo funcionamiento. Posteriormente se siguieron los mismos pasos que en el apartado 3.1.1.1.

### 3.2. Ensayos de citometría de flujo

Las células se levantaron usando Acutasa. En este caso, la incubación a 37ºC se prolongó hasta 6 min para asegurar que las células no se encontraban formando agregados, ya que dificultarían el análisis. Las células se contaron empleando la cámara de Neubauer y se distribuyeron unas 200.000 por condición. Se centrifugaron 3 min a 200 g y se lavaron con PBS. El lavado se repitió entre los pasos posteriormente expuestos.

En el marcaje intracelular, las células se fijaron previamente con una solución de formaldehído al 4%. En este caso, se lavó dos veces para eliminar, en la mayor medida posible, los restos de formaldehído, al ser tóxico para las células. Los anticuerpos primarios y secundarios se prepararon en una solución de bloqueo (PBS con un 5% de SFB), que en el caso del marcaje intracelular contenía además un 0,1% de saponina para favorecer la permeabilización y la entrada del anticuerpo. Los anticuerpos primarios (Tabla 3.5) se incubaron durante 1 hora. Para poder detectarlos, tras lavar la muestra, se incubó 30 minutos con el correspondiente anticuerpo secundario marcado con el fluorocromo Alexa flúor 488 (*Goat Anti-mouse o Anti-rat 488*). Las incubaciones y las distintas soluciones se mantuvieron en frío para ralentizar el metabolismo celular y evitar así la degradación de los anticuerpos.

Anticuerpo	Especie	Concentración final	Proveedor
$\alpha$ SSEA4	Ratón	0,5 µg/ml (1:76)	DSHB
$\alpha$ NANOG	Ratón	0,5 µg/ml (1:46)	DSHB
$\alpha$ OCT3/4	Rata	2 µg/ml (1:200)	R&D SYSTEMS

Tabla 3.5.- Anticuerpos primarios utilizados en los ensayos de citometría de flujo.

La distinción entre las células vivas y muertas se realizó empleando el reactivo SYTOX® (Thermo Fisher), proporcionado por la unidad de citometría de flujo y separación celular del centro de investigación Biomédica de Aragón (CIBA). Dicho agente se añadió al final, en el caso del marcaje extracelular, y antes de la fijación, en el caso del marcaje intracelular. Como control negativo de autofluorescencia celular se usaron células sin ningún marcaje (blanco). Como control de especificidad del anticuerpo secundario se utilizaron células marcadas únicamente con este anticuerpo.

Se utilizó un citómetro FACSaria (BD BioSciences) equipado con un láser a 488 nm, operado por la unidad de citometría de flujo y separación celular del CIBA. Los datos obtenidos se analizaron con el programa Kaluza Analysis.

### 3.3. Estudio de expresión génica

#### 3.3.1. Extracción de RNA

Para la extracción del RNA, las células se homogeneizaron previamente en el reactivo TRIzol (Invitrogen) y se pasaron unas 10 veces por una aguja de 25 gauges. Las muestras se guardaron a -80°C si no se procedió directamente a la obtención del RNA.

A partir de la preparación anterior, el RNA se aisló con un protocolo puesto a punto por M. Sánchez y J. Schoorlemmer. Dicho protocolo está basado en una extracción con fenol-cloroformo y precipitación con isopropanol. Brevemente, al volumen de TRIzol se le añadió cloroformo y se generaron 3 fases tras haber incubado y centrifugado. En la fase superior acuosa se localizó el RNA, al que se le añadió 0,6 V de isopropanol y 1,5 µl de glucógeno, que actúa como co-precipitante mejorando la visualización del *pellet*. El *pellet* se lavó con etanol (EtOH) al 75%, se resuspendió en MQ libre de RNasas y se incubó unos 5 minutos a 37°C para conseguir una correcta homogeneización. Para eliminar la posible contaminación con DNA genómico, se utilizó *RQ1 RNase Free DNase* (Promega), que se incubó 15 minutos a 37°C para que actuara.

Tras el tratamiento enzimático, se procedió a la extracción con fenol y cloroformo. Primero se añadió fenol, que desnaturalizó posibles proteínas contaminantes, localizándose los ácidos nucleicos en la fase superior acuosa. A esta fase se le adicionó cloroformo, reactivo que separó los contaminantes a la fase orgánica, quedando el RNA en la fase acuosa. Para extraer la mayor cantidad posible de RNA, se repitió el proceso de extracción añadiendo MQ en lugar de fenol en el primer paso. Finalmente, se re-precipitó la fase acuosa añadiendo 0,1 V de acetato de sodio, 3 V de EtOH al 100% y 1,5 µl de glucógeno. El *pellet* se lavó con EtOH al 75%, se resuspendió en MQ libre de RNasas y se determinó la concentración con un espectrofotómetro Nanodrop ND-2000 de Thermo Scientific.

#### 3.3.2. Retrotranscripción del RNA: Obtención del cDNA

El cDNA se obtuvo por retrotranscripción del RNA siguiendo el protocolo del fabricante del Kit empleado *PrimeScript RT reagent* de Takara, usando tanto *Random hexamers* como *Oligo(dT)*. La transcripción reversa se desarrolló durante 15 minutos a 37°C, inactivando la enzima con calor (5 segundos a 85°C). El producto obtenido se mantuvo a 4°C, en caso de uso inmediato o bien se almacenó a -20°C. La correcta retrotranscripción se comprobó mediante PCR.

### 3.3.3. Reacción en cadena de la polimerasa: PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite la amplificación logarítmica de un fragmento de DNA. Las condiciones finales de reacción (temperatura de alineamiento de los *primers* ( $T_m$ ) y concentración de magnesio ( $Mg^{2+}$ ) se determinaron tras la realización de una serie de ensayos. Para la amplificación se utilizó la enzima Taq polimerasa de *Thermus aquaticus* (Sigma-Aldrich). El volumen de reacción final (50  $\mu$ l, incluyendo el material genético) contenía los siguientes reactivos, con su correspondiente concentración final: Taq polimerasa (0,5 u/ $\mu$ l), Buffer (1X), dNTPs (0,2  $\mu$ M) y *primers* (0,4  $\mu$ M) (Ver Anexo).

La amplificación se realizó en el termociclador Veriti<sup>TM</sup> con el siguiente programa: 2 minutos a 98°C, 35 ciclos de 3 etapas de 1 minuto cada una a 94°C, 60°C y 72°C, y 5 minutos a 72°C. Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 1,5% y se visualizaron con Gel Red (1:10.000) en un transiluminador BioRad. Como marcador de peso molecular se empleó *GeneRuler 100bp Plus DNA ladder* de Thermo Scientific.

## 3.4. Estudio de niveles de metilación

### 3.4.1. Extracción de DNA genómico con el buffer de lisis FG2

Para la extracción del DNA genómico (gDNA) se partió de una placa de cultivo o *pellet* de células, a lo que se añadió 500  $\mu$ l del buffer de lisis FG2. En el caso de la placa de cultivo, las células se levantaron con ayuda de un rascador. Posteriormente, se añadieron 500  $\mu$ g/ml de proteinasa K, que es capaz de degradar proteínas incluso en presencia de detergentes, y se incubó toda la noche a 55°C en un baño termostatizado.

Al día siguiente, se añadieron 500  $\mu$ l del alcohol 2-propanol, para conseguir la precipitación del ácido nucleico tras su mezcla en el vortex y centrifugación 5 minutos a 2500 g. El *pellet* se lavó con EtOH al 70% y finalmente se resuspendió en TE. Las muestras se incubaron a 55°C durante 4 horas para facilitar la solubilización del gDNA del *pellet* obtenido. La concentración y calidad del DNA se midió usando el espectrofotómetro Nanodrop ND-2000 de Thermo Scientific. El material genético se conservó a 4°C.

### 3.4.2. Extracción de DNA genómico precipitando con etanol

El protocolo empleado se adaptó de Hongao et al. 2008 (53). La precipitación del DNA se consiguió añadiendo 0,4 ml de EtOH al 100% por cada ml de TRIzol de partida. Se incubó 2 ó 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó 4 min a 4ºC y 2000 g. Las proteínas se quedaron en la fase acuosa, pudiéndose recuperar en caso de interés. El DNA se lavó dos veces con una solución 0,1 M de citrato sódico (con un 10% de EtOH) y se incubó cada lavado 30 minutos. Finalmente, se lavó con 1,5 ml de EtOH al 75% y se centrifugó durante unos 15 minutos. El *pellet* obtenido se resuspendió en una solución 8 mM de NaOH.

El protocolo se empleó para obtener el DNA tras la extracción del RNA de un *pellet* de progenitores neuronales (NSC: *Neural Stem cells*), cedido amablemente por el grupo de Eduardo Ruiz Pesini de la Universidad de Zaragoza.

### 3.4.3. Conversión con bisulfito

El DNA genómico se convirtió con bisulfito siguiendo el protocolo del kit comercial *EZ DNA Methylation kit* de Zymo Research. Brevemente, el Kit consigue, con 3 pasos, convertir las citosinas no metiladas en uracilos. La desulfonación en columna del kit permite eliminar posibles precipitados no deseados. El DNA convertido se eluyó con TE y se guardó hasta su utilización a -20ºC.

El gDNA de las neuronas dopaminérgicas fue cedido amablemente por el grupo de Eduardo Ruiz Pesini de la Universidad de Zaragoza.

### 3.4.4. Reacción en cadena de la polimerasa: PCR

En este caso, se trata de una reacción en cadena de la polimerasa que permite la preparación del material a secuenciar, a través de la amplificación de un fragmento de DNA convertido previamente con bisulfito, gracias a los *primers* convenientemente diseñados. Las condiciones finales de la reacción, como la temperatura de alineamiento de los *primers* o la concentración de magnesio, fueron determinadas previamente. La enzima utilizada fue *Thermus aquaticus* de Sigma-Aldrich. El volumen de reacción final (50 µl) contenía los siguientes reactivos, con su correspondiente concentración final: Taq polimerasa (0,5 u/µl), Buffer (1X), dNTPs (0,2 µM), Mg<sup>2+</sup> (2,5 mM), gDNA (2 ng/µl) y *primers* (0,4 µM) (Ver Anexo). El gDNA se incubó, antes de añadirse, 3 minutos a 100ºC para favorecer la separación de las hebras de DNA.

La amplificación se llevó a cabo en el termociclador Veriti™ con el siguiente programa: 40 ciclos de 3 etapas de 30 segundos cada una a 94ºC, 60ºC y 72ºC, y una última etapa de 10 minutos a 72ºC. Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 2 % y se visualizaron del mismo modo que en el apartado 3.3.3.

### 3.4.5. Secuenciación del material genético por pirosecuenciación

Gracias al uso de un primer biotinilado en la reacción de PCR, fue posible separar una de las cadenas utilizando perlas de estreptavidina-sefarosa y conocer su secuencia nucleotídica.

Las muestras se pirosecuencian por la unidad de genómica del CIBA con el programa PyroQ-CpG 1.09 de QIAGEN (Fig. 3.2). Este tipo de secuenciación se basa en la detección de la señal luminosa que se genera con la incorporación del nucleótido correspondiente. Cuando el nucleótido se incorpora, se libera un pirofosfato, que es usado por una ATP sulfókilasa para convertirlo en ATP, que la luciferasa, junto a la luciferina, transformará en luz. La altura del pico es proporcional a la señal luminosa registrada y, por tanto, el número de nucleótidos incorporados.



**Figura 3.2.- Imagen del programa PyroQ-CpG 1.09 utilizado en pirosecuenciación.** En la parte superior el nombre del experimento y los datos que se tienen de él, como el primer a usar. Posteriormente la secuencia a analizar y el orden de dispensación de los nucleótidos a la máquina. En la parte inferior, el histograma, con el número de nucleótidos incorporados por orden.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Acondicionamiento de las células ES [4]

Las células ES [4] se asemejan morfológicamente a las células epiteliales con una relación núcleo-citoplasma característica. Crecen en monocapa, formando colonias con bordes definidos (Fig. 4.1). Las células se mantienen en el medio mTeSR™1, de la casa comercial STEMCELL Technologies. Dicho medio tiene un coste elevado, por lo que se trató de adaptar a las células hES al medio condicionado de fibroblastos (MEFCM) (Ver Anexos).

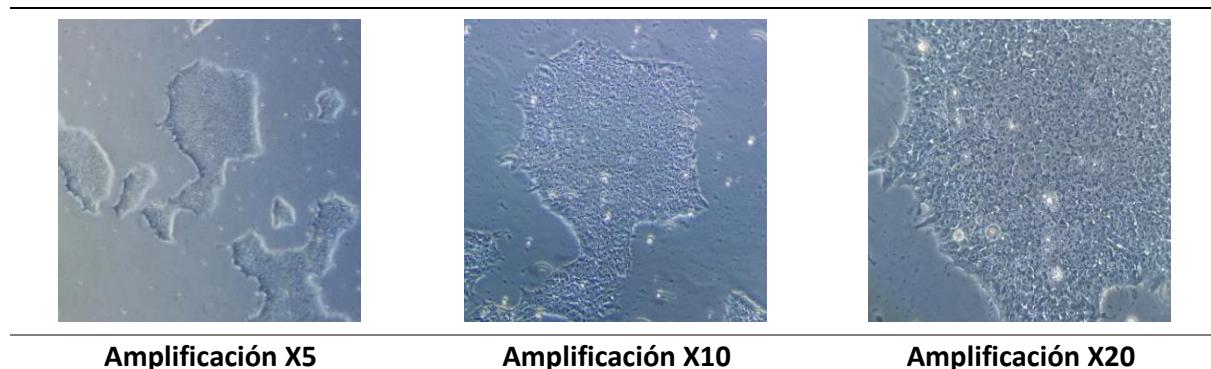


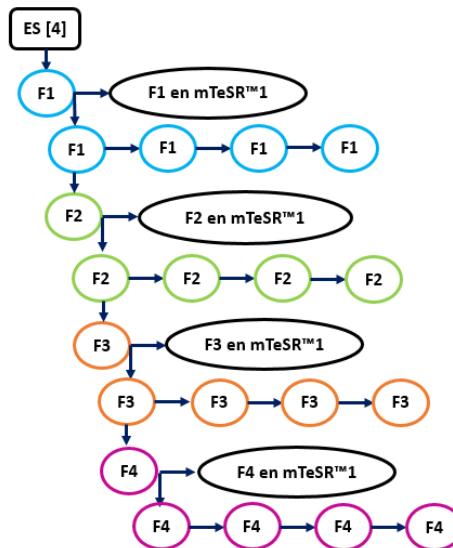
Figura 4.1.- Morfología de las colonias de las células ES [4].

La adaptación de la línea celular ES [4] al medio MEFCM se realizó en 4 fases, con diferentes condiciones de cultivo, donde se disminuyó de forma progresiva la proporción del medio comercial mTeSR™1 (Tabla 4.1). Suponiendo que el medio comercial contenía el factor de crecimiento FGF2, se suplementó con dicho factor al medio condicionado para evitar su ausencia. Se usó una concentración final de 8 ng/ml, al haber sido utilizada en otros ensayos como el de Gerrard et al. 2005 (36) con unas condiciones de cultivo similares (cultivo en Matrigel y uso del medio MEFCM).

Composición del medio en cada fase	mTeSR™1	MEFCM + 8 ng/ml de FGF2
Fase 1 (F1)	75%	25%
Fase 2 (F2)	50%	50%
Fase 3 (F3)	25%	75%
Fase 4 (F4)	-	100%

Tabla 4.1.- Composición del medio empleado en las distintas fases de adaptación de las hESCs. Al medio condicionado de MEFs (MEFCM) se le suplementó el factor de crecimiento FGF2, a una concentración de 8 ng/ml.

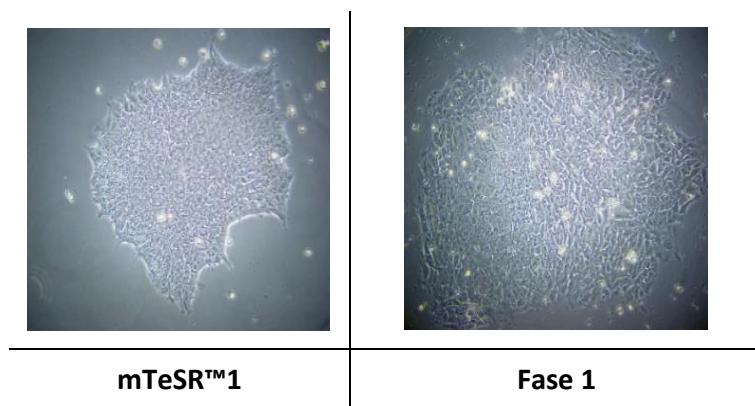
Al pasar las células hES con ReLeSR™, parte de ellas se mantuvieron en el medio en el que se encontraban y parte se usaron para probar una nueva fase del acondicionamiento (Fig. 4.2), con un cambio en la composición del medio según la fase (Tabla 4.1). Las células se pasaron cada 4 ó 5 días, con una dilución 1:3 o 1:4, según el tamaño de las colonias y confluencia. La evaluación de la conservación de la pluripotencia de las distintas fases de acondicionamiento se testó morfológicamente, mediante la siembra de las células en un medio compuesto únicamente por mTeSR™1 y genéticamente, analizando marcadores de pluripotencia por PCR.



**Figura 4.2.- Representación del proceso de adaptación de las células ES [4] del medio mTeSR™1 al medio condicionado de fibroblastos de ratón (MEFCM).**

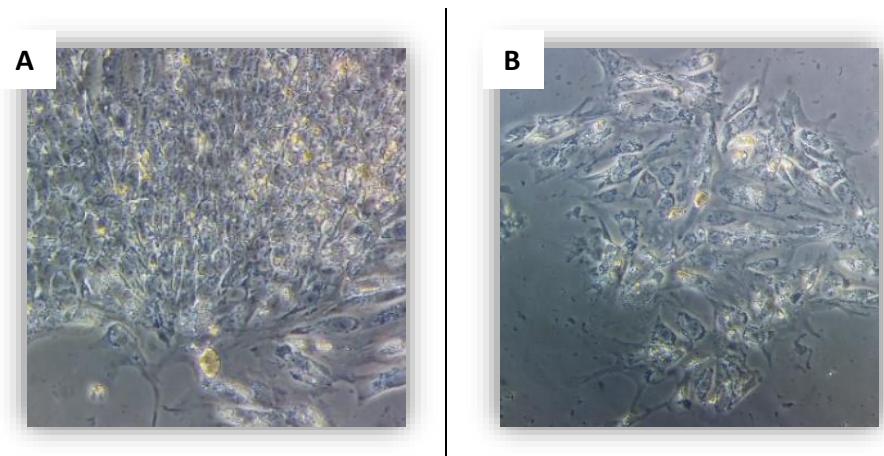
Los círculos indican la fase en la que nos encontramos y las flechas los pasos de las células, en los que se pueden mantener esas condiciones, iniciar nuevas (una nueva fase) o bien volver al medio mTeSR™1.

Al comenzar el proceso de adaptación de las células ES [4] y usar un 25% de MEFCM (Fase 1) (Tabla 4.1), se observó un cambio significativo en la morfología, que se mantuvo en el resto de las fases de adaptación (F2, F3 y F4). Dicho cambio consistió principalmente en un aumento del tamaño de las células que componían la colonia y una pérdida de la definición de los bordes de la misma (Fig. 4.3).



**Figura 4.3.- Imagen de las colonias de ES [4] en dos condiciones de cultivo.** En mTeSR™1 se observaron colonias compactas de bordes definidos, a diferencia del medio utilizado en la primera fase del proceso de adaptación (Fase 1). Fase 1: 25% MEFCM + 75% mTeSR™1. Amplificación x10.

El cambio de composición del medio durante el acondicionamiento afectó negativamente a la tasa de crecimiento celular. Se observó una menor frecuencia de pase, cada 4 ó 5 días, y una dilución mayor, 1:3 o 1:4, en comparación con las células en el medio mTeSR™1, pase cada 3 ó 4 días con una dilución 1:8 o 1:10. En la fase 4 del acondicionamiento, en la que el medio no contuvo mTeSR™1, las colonias tuvieron mucha muerte celular (Fig. 4.4A) y las células mostraron un aspecto fragmentado (Fig. 4.4B), que no mejoró con el paso del tiempo, ni con el aumento de la densidad celular del cultivo. La disminución de la viabilidad en el tiempo con cada pase indicó que, bajo las condiciones propuestas, no se consiguió el crecimiento de las hESCs (Tabla 4.1).



**Figura 4.4.- Imagen de las colonias de hESCs en la fase de adaptación F4.** Células mantenidas en las condiciones de cultivo de la fase 4 (100% de MEFCM) durante 21 (A) y 22 días (B), habiendo realizado 4 pases celulares. Muerte celular en las colonias (zonas de coloración más clara) (A) y células con aspecto fragmentado (B). Amplificación x20.

El cambio en la forma de las colonias puede indicar que las células se están diferenciando. Para comprobar que las células en las distintas fases seguían siendo pluripotentes, se decidió sembrar las células en el medio comercial mTeSR™1 (Fig. 4.5). Al volver de nuevo al medio original, se recuperó la morfología típica de las colonias, más compactas y de bordes definidos. Esto indicó que el cambio en su forma no se debía a que se estuvieran diferenciando.

Estos resultados morfológicos se corroboraron con estudios de expresión de factores de transcripción asociados a pluripotencia (OCT4 y REX1). Primero se realizó la puesta a punto de estos ensayos, determinando que la temperatura de alineamiento de los *primers* (*T<sub>m</sub>*) era de 60°C y la concentración de Mg<sup>2+</sup> de 1,5 mM. También se analizó la especificidad de los *primers* a través del uso de controles negativos, células o tejidos donde no se espera encontrar expresión. Se escogieron como controles negativos placenta y células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) por su disponibilidad en el laboratorio. En los ensayos, se utilizó el gen constitutivo *GAPDH* como control interno de la cantidad de cDNA añadido y MQ como control de ausencia de amplificación sin cDNA.

---

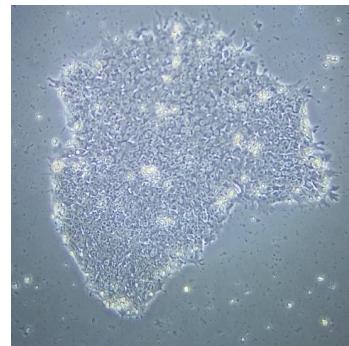
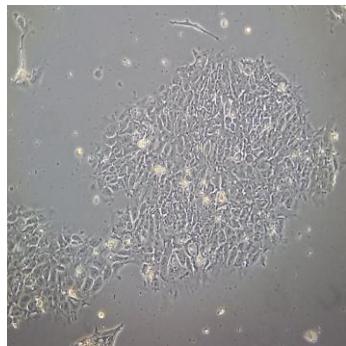
**Fase del acondicionamiento**  
**mTeSR™1 + MEFCM con 8 ng/ml de FGF2**

---

**Fase → mTeSR™1**

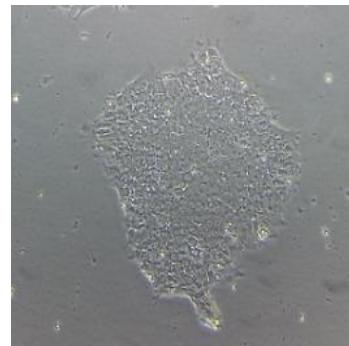
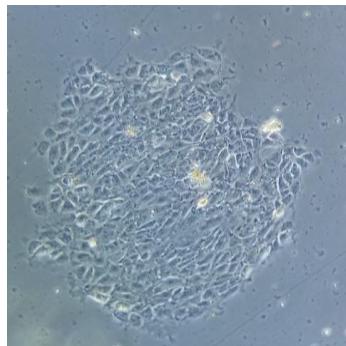
**Fase 2  
(F2)**

50% MEFCM  
+  
50% mTeSR™1



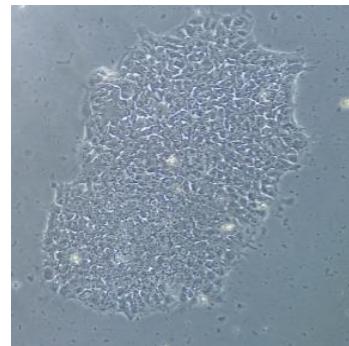
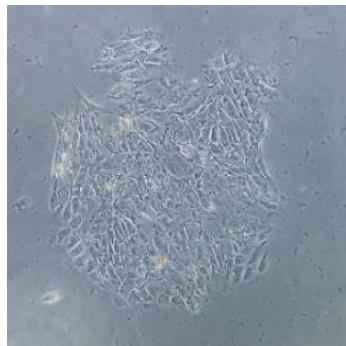
**Fase 3  
(F3)**

75% MEFCM  
+  
25% mTeSR™1



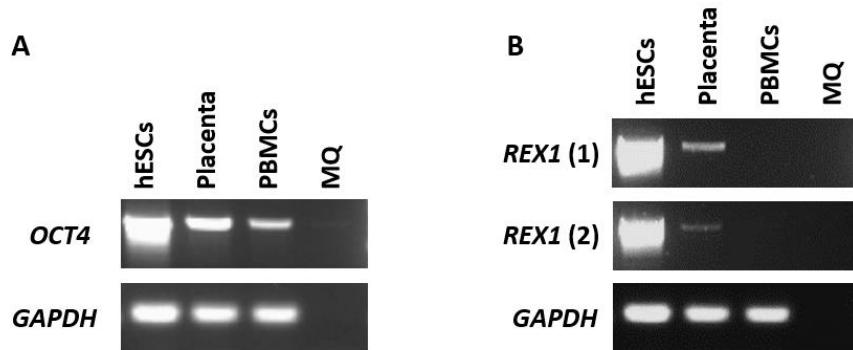
**Fase 4  
(F4)**

100% MEFCM



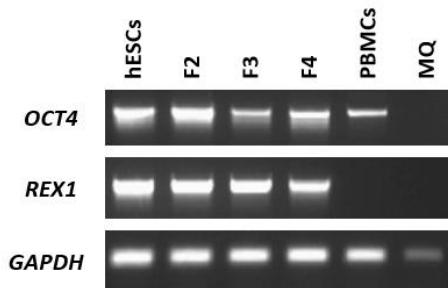
**Figura 4.5.- Comparación de las colonias en las fases del proceso de adaptación al MEFCM y mTeSR™1.**  
Colonias de las células ES [4] en las diferentes composiciones de los medios utilizados en las fases de acondicionamiento: F2 (50% MEFCM + 50% mTeSR™1), F3 (75% MEFCM + 25% mTeSR™1) y F4 (100% MEFCM). Amplificación x10.

En cuanto a *OCT4*, se observó un producto de amplificación del tamaño esperado (573 pb) en el cDNA de las hESCs. También se obtuvo producto de amplificación en placenta y PBMCs, aunque de menor intensidad (Fig. 4.6A). En el caso de *REX1*, se analizaron dos parejas de primers: *REX1 (1)* y *REX1 (2)*. Se observaron productos de amplificación del tamaño esperado (480 y 420 pb, respectivamente) en hESCs y en placenta, donde la intensidad de la banda fue menor. No se observaron bandas en PBMCs (Fig. 4.6B). Esto indicó que la especificidad de los primers de *REX1* fue mayor que la de los primers de *OCT4*. Se decidió usar finalmente la pareja *REX1 (2)* al haber obtenido una amplificación menor en placenta y una mejor definición del amplicón.



**Figura 4.6.- Puesta a punto de los ensayos de expresión para *OCT4* y *REX1* y comprobación de la especificidad de los primers en placenta y PBMCs. Uso de hESCs como control positivo. Placenta y PBMCs como control de especificidad de los primers *OCT4* y *REX1*. (A) Análisis de la expresión de *OCT4*. B) Análisis de la expresión de dos parejas de primers de *REX1* (*REX1 (1)*) y (*REX1 (2)*).**

Tras la puesta a punto de los ensayos, se llevó a cabo el estudio de expresión en las células hESCs en las fases de adaptación F2, F3 y F4. Se obtuvieron productos de amplificación del tamaño esperado para *OCT4* y *REX1* en las células analizadas (Fig. 4.7). No se observaron diferencias claramente significativas entre las células en los diferentes estadios del proceso de acondicionamiento. Esto indicó que las células adaptadas seguían expresando marcadores de pluripotencia a pesar del cambio morfológico.

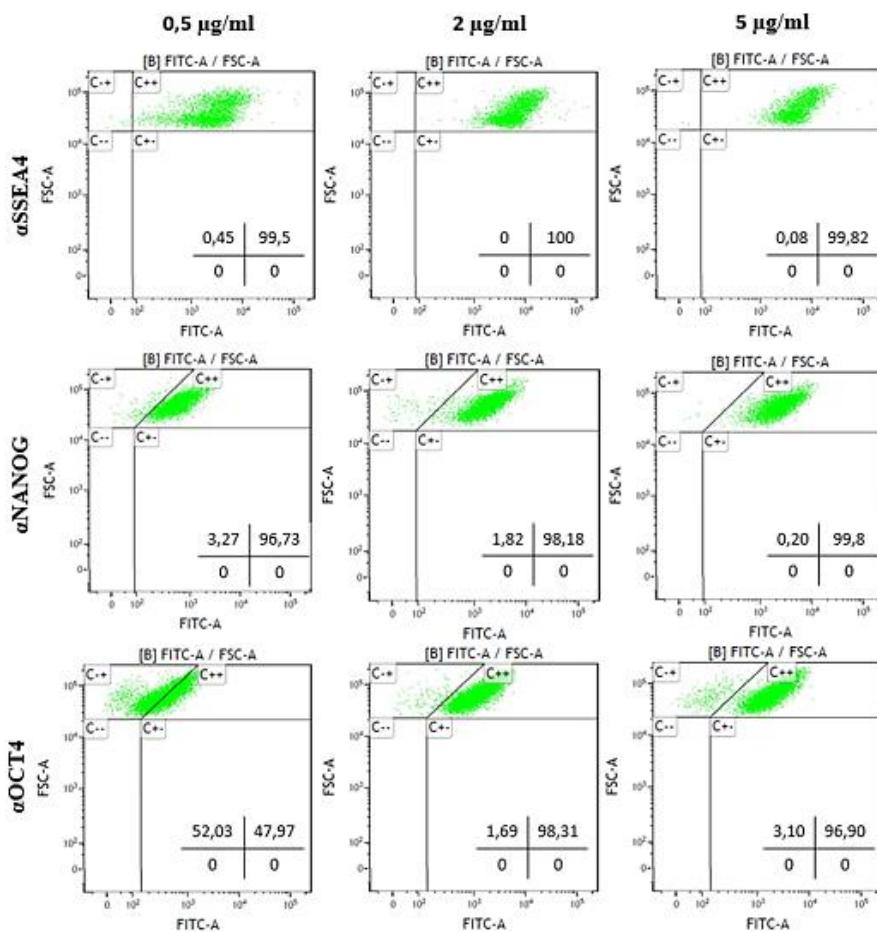


**Figura 4.7.- Expresión de *OCT4* y *REX1* en las células hESCs obtenidas en las diferentes fases del acondicionamiento: F2, F3 y F4. PBMCs como control de especificidad de los primers de *OCT4* y *REX1*. MQ como control negativo.**

## 4.2. Puesta a punto del ensayo de citometría

Con el objetivo de poder caracterizar las hESCs por citometría, se pusieron a punto unos ensayos y se optimizaron las concentraciones de los anticuerpos. Los anticuerpos fueron los factores de transcripción OCT4 y NANOG, y el glucoesfingolípido de superficie SSEA4, todos ellos marcadores característicos de las hESCs. Para analizar la presencia o ausencia de estas proteínas, se realizaron marcas tanto a nivel de membrana, en el caso de SSEA4, como a nivel intracelular-nuclear, en el caso de OCT4 y NANOG.

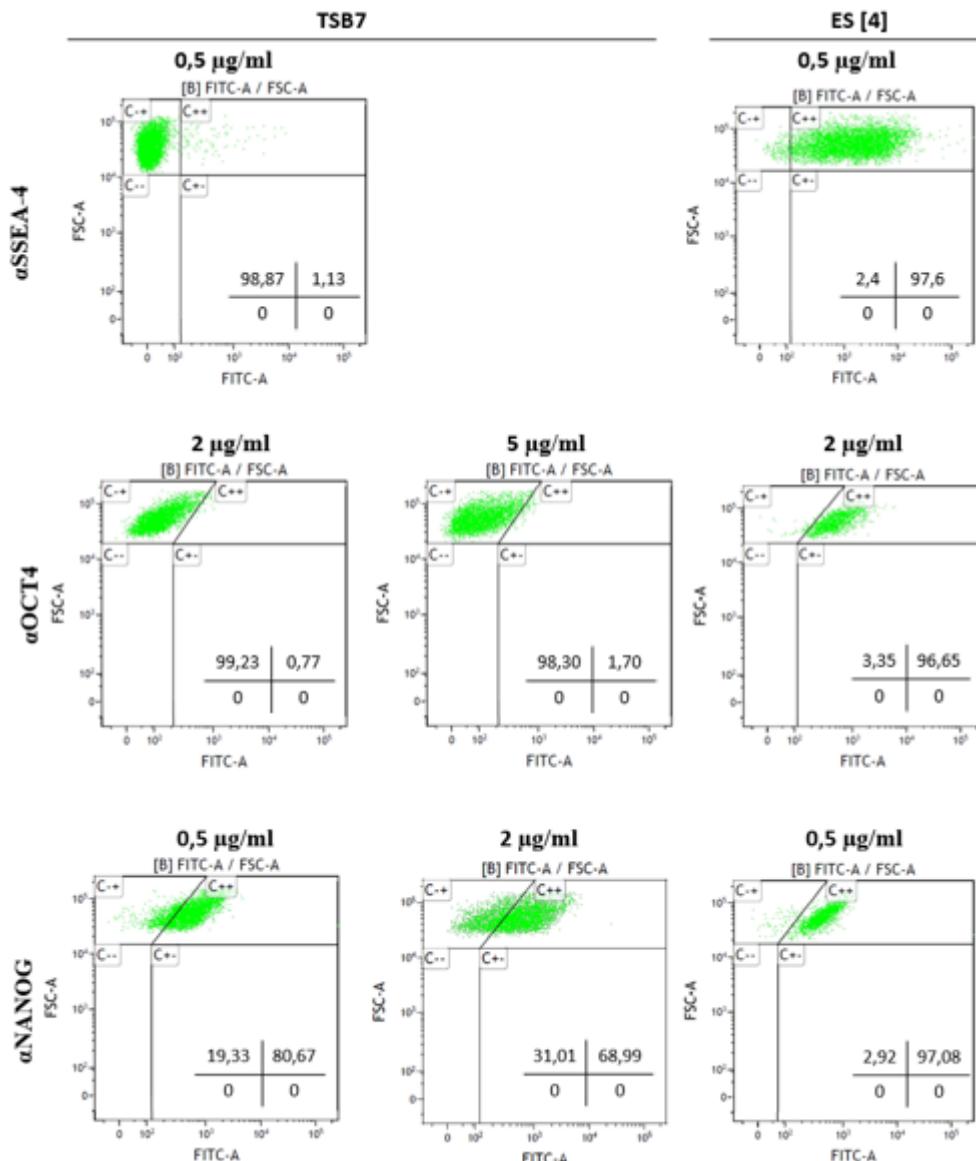
Para optimizar la concentración de los anticuerpos se testaron 3 concentraciones, dos de ellas en el límite del rango recomendado por la casa comercial (2 µg/ml y 5 µg/ml), y una concentración inferior (0,5 µg/ml) (Fig. 4.8). La población de interés a analizar se seleccionó según el tamaño, complejidad celular y viabilidad. Los cuadrantes se definieron atendiendo a la autofluorescencia de las células y la fluorescencia inespecífica del anticuerpo secundario.



**Figura 4.8.- Optimización de la concentración de los anticuerpos primarios  $\alpha$ SSEA4,  $\alpha$ NANOG y  $\alpha$ OCT4 para su uso en citometría.** En la parte superior, las 3 concentraciones a testar en las hESCs: 0,5, 2 y 5 µg/ml. En el lateral, los anticuerpos analizados ( $\alpha$ SSEA4,  $\alpha$ NANOG y  $\alpha$ OCT4). Resultados representados como diagrama de puntos en función de la señal de fluorescencia (FITC) y el tamaño celular (FSC). Los números de la tabla hacen referencia al porcentaje de población de cada cuadrante.

Se encontró señal de fluorescencia positiva (Fig. 4.8) para todas las concentraciones de los anticuerpos analizados en las hESCs. En el caso de  $\alpha$ SSEA4, el porcentaje de población positiva medio para las 3 concentraciones fue del 99,8% (99,5% para 0,5  $\mu$ g/ml, 100% para 2  $\mu$ g/ml y 99,82% para 5  $\mu$ g/ml). Para  $\alpha$ NANOG, el porcentaje de población positiva medio fue de 98,2% (96,7% para 0,5  $\mu$ g/ml, 98,18% para 2  $\mu$ g/ml y 99,82% para 5  $\mu$ g/ml). En el caso de  $\alpha$ OCT4, el porcentaje de población positiva medio fue del 81% (47,9% para 0,5  $\mu$ g/ml, 98,31% para 2  $\mu$ g/ml y 96,90% para 5  $\mu$ g/ml). Las concentraciones más apropiadas para usar los anticuerpos se determinaron en función del porcentaje de población positiva (siendo necesario un porcentaje mayor al 90%) y el uso razonable de los reactivos, que supusiera el menor consumo posible. Así, se decidió que las concentraciones para usar los anticuerpos eran 0,5  $\mu$ g/ml para  $\alpha$ SSEA4 y  $\alpha$ NANOG, y 2  $\mu$ g/ml para  $\alpha$ OCT4.

Una vez se demostró que los anticuerpos marcaban un alto porcentaje de hESCs (Fig. 4.8), se comprobó la especificidad de unión de los anticuerpos primarios con una línea de células trofoblásticas de ratón (TSB7), que no expresa los marcadores del estudio (54). El ensayo de especificidad mostró que, los anticuerpos  $\alpha$ SSEA4 y  $\alpha$ OCT4 se unían de forma específica, con un porcentaje de población positiva para el marcaje fluorescente en las células TSB7 bajo (1,13% para 0,5  $\mu$ g/ml de  $\alpha$ SSEA4, 0,77% para 2  $\mu$ g/ml de  $\alpha$ OCT4 y 1,70% para 2  $\mu$ g/ml de  $\alpha$ OCT4). El anticuerpo  $\alpha$ NANOG se unió de forma inespecífica, al encontrar señal de fluorescencia en las células TSB7, con un porcentaje de población positiva elevado (80,67% para 0,5  $\mu$ g/ml y 68,99% para 2  $\mu$ g/ml) (Fig. 4.9). Para tratar de solucionar la aparente falta de especificidad de  $\alpha$ NANOG, se introdujo en el protocolo un paso de bloqueo de entre 15 y 30 minutos usando albúmina sérica bovina o suero fetal bovino. Este tratamiento no mejoró los resultados (datos no mostrados), indicando que no hay tinción específica de NANOG, invalidando su uso.

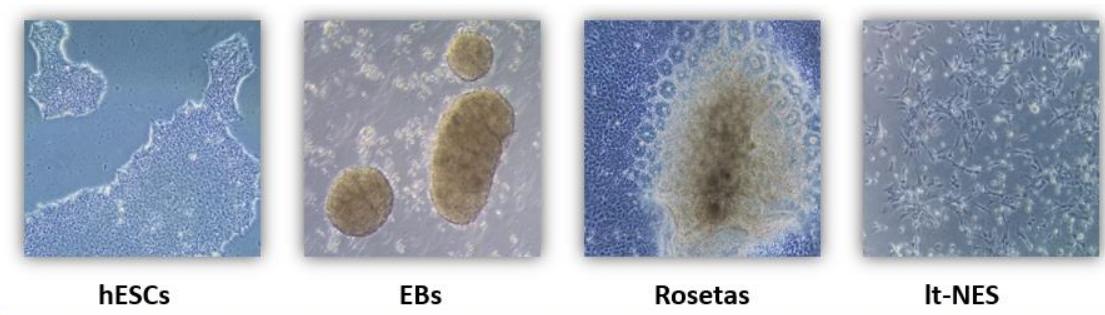


**Figura 4.9.- Estudio de la especificidad de los anticuerpos primarios  $\alpha$ SSEA4,  $\alpha$ NANOG y  $\alpha$ OCT4 en células trofoblásticas de ratón (TSB7).** En la parte superior, tipos celulares empleados en el estudio (TSB7 y ES [4]). En el lateral, los anticuerpos analizados ( $\alpha$ SSEA4,  $\alpha$ NANOG y  $\alpha$ OCT4). En la parte superior de cada fila de anticuerpos, la concentración a la que se testaron (0,5 µg/ml para  $\alpha$ SSEA4 en TSB7 y hESCs, 2 µg/ml y 5 µg/ml para  $\alpha$ OCT4 en TSB7, 2 µg/ml para  $\alpha$ OCT4 en hESCs, 0,5 µg/ml y 2 µg/ml para  $\alpha$ NANOG en TSB7 y 0,5 µg/ml para  $\alpha$ NANOG en hESCs). Resultados representados como diagrama de puntos en función de la señal de fluorescencia (FITC) y el tamaño celular (FSC). Los números de la tabla hacen referencia al porcentaje de población de cada cuadrante.

### 4.3. Establecimiento de la línea de precursores neuronales

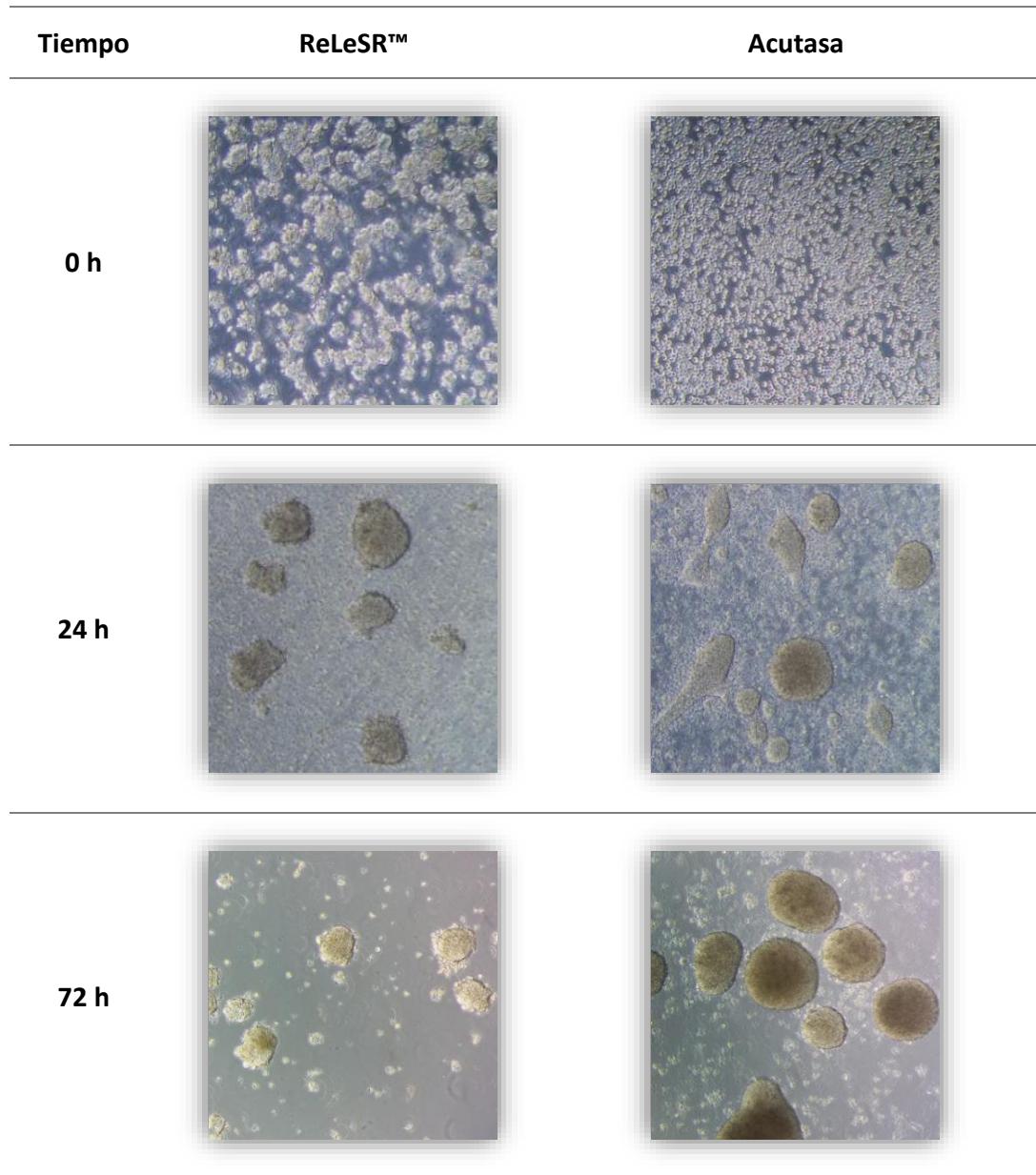
Con el objetivo de generar un modelo celular que permitiera estudiar diferentes aspectos relacionados con esclerosis múltiple, como la metilación de HERV-W, se trató de establecer una línea de precursores neuronales denominada It-NES (*long term neuroepithelial stem cells*).

El procedimiento que se siguió constó de una serie de pasos (Ver Materiales y Métodos) que requirieron su optimización. La diferenciación comenzó con la generación de los EBs a partir de las hESCs y, posteriormente, el neuroectodermo primitivo, que se caracterizó por la formación de las estructuras denominadas rosetas. Finalmente, se obtuvieron las células It-NES (Fig. 4.10) (38).



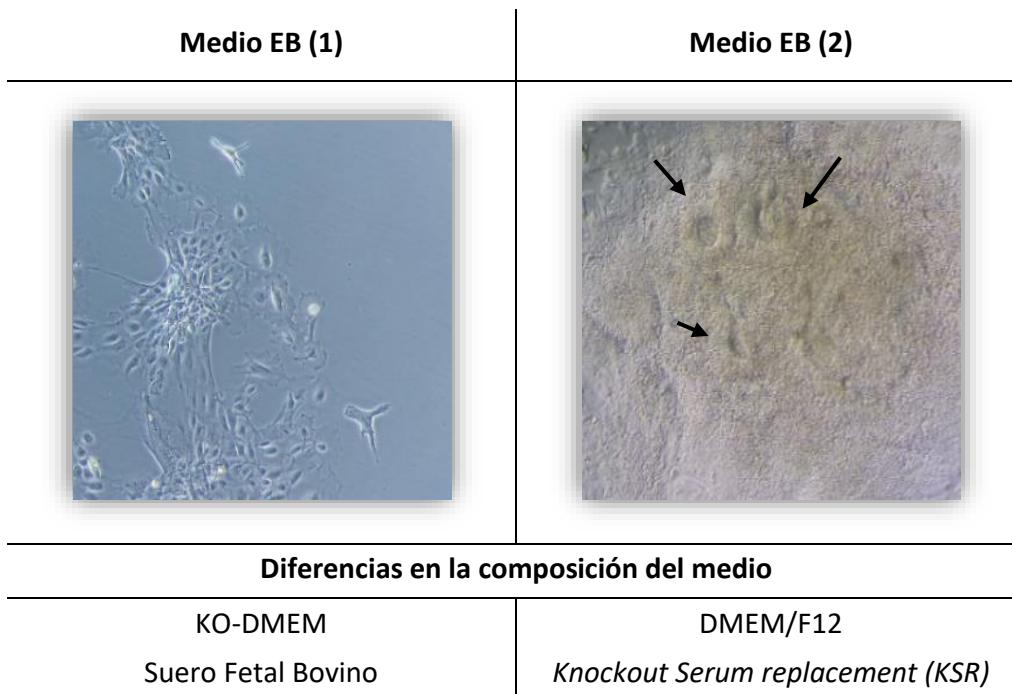
**Figura 4.10.- Principales estadios en el proceso de diferenciación.** Imágenes del cultivo en algunas de las etapas claves de la diferenciación: hESCs, EBs, rosetas y precursores neuronales It-NES (*long term neuroepithelial stem cells*). Amplificación x 10.

En primer lugar, se probaron dos reactivos diferentes para levantar las hESCs, ReLeSR™ y Acutasa (Ver Materiales y Métodos). En el caso de ReLeSR™, se formaron pequeños agregados celulares que favorecieron la supervivencia celular. A las 24 horas los EBs ya se habían formado y tenían bordes definidos. La Acutasa disoció a las células en *single cells*, siendo necesaria la adición de RI para favorecer la viabilidad. A las 24 horas se habían formado algunos EBs, pero la mayoría de los agregados celulares se encontraban adheridos a la placa y eran levantados al cambiar el medio. Con el tiempo, los cuerpos formados con Acutasa aumentaron su tamaño y la definición de sus bordes, mientras que los cuerpos generados con ReLeSR™ empeoraron, reduciendo la definición de su contorno y viabilidad (Fig. 4.11). El seguimiento de la progresión de los cuerpos hasta el 4 ó 5 día, indicó que, el reactivo con el que se formaban mejores EBs y había mayor supervivencia fue la Acutasa.



**Figura 4.11.- Evolución en el tiempo de los cuerpos embrioides según el reactivo usado para su formación.** En el caso de ReLeSR™, pequeños agregados a las 0 h, cuerpos formados a las 24 h y pérdida de la viabilidad de los cuerpos a las 72 h. Para Acutasa, células disociadas a las 0 h, cuerpos principalmente adheridos a la placa y en formación a las 24 h y cuerpos formados, con bordes definidos, a las 72 horas. Imágenes pertenecientes a uno de los intentos realizados, empleando un medio EB que contenía suero fetal bovino y KO-DMEM. Amplificación x10.

Los EBs se mantuvieron en suspensión durante los dos primeros días en medio mTeSR™1 y los 2 siguientes en medio EB. Al comienzo, se utilizó un medio EB (EB (1)) que contenía KO-DMEM y suero fetal bovino. Con este medio se obtuvo un bajo o nulo rendimiento en la obtención de rosetas, por lo que, tras más de 3 intentos fallidos, se decidió modificar el medio, utilizando KSR (*Knockout serum replacement*) en lugar de suero y DMEM/F12 en lugar de KO-DMEM (medio EB (2)). Con el uso del nuevo medio EB (2) se consiguió un aumento de la viabilidad celular y la formación de rosetas (Fig. 4.12).



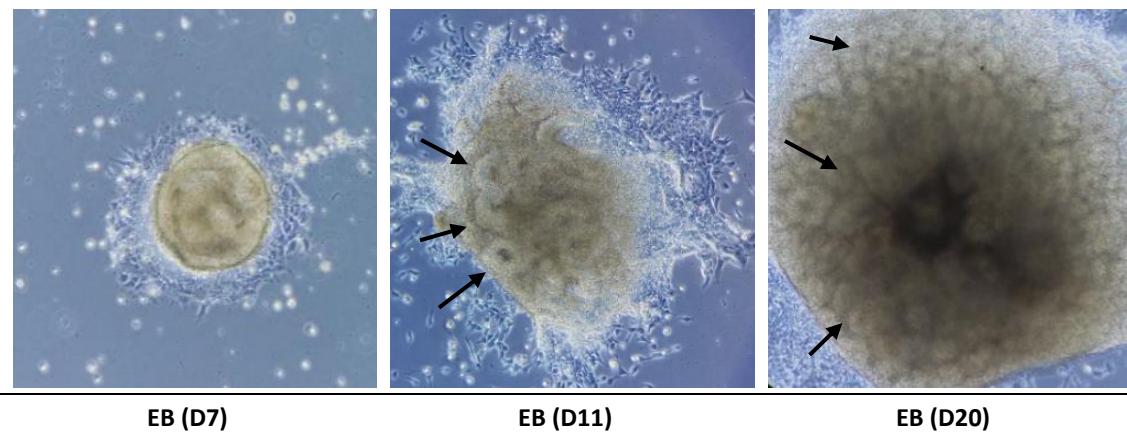
**Figura 4.12.- Diferencias entre los diferentes medios EB utilizados.** En el medio EB (1), compuesto por KO-DMEM y suero fetal bovino, ausencia de rosetas y presencia de células con aspecto diferenciado; aplanadas, núcleo más definido y bordes más suaves. En el medio EB (2), con DMEM/F12 y KSR como componentes, presencia de rosetas (marcadas con flechas negras). Imágenes al día 10 (D10) de uno de los intentos de diferenciación. Amplificación x10.

#### 4.3.1. Formación de las rosetas

Los EBs de 5 días se sembraron en placas con PLO/LN y se cambió al medio ITS FN (Ver Materiales y Métodos). Este medio de inducción se caracteriza porque, en él, la mayoría de las células mueren y sólo sobreviven y proliferan en el tiempo los precursores neuronales (31).

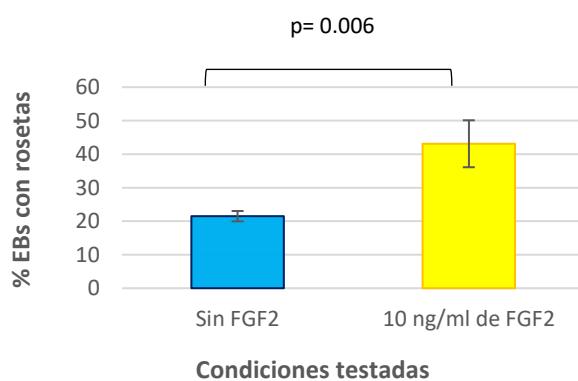
Al comienzo, los EBs se adhirieron a la placa y empezaron a generar una monocapa de células a su alrededor (Fig. 4.13 EB (D7)). Con el tiempo, las células de la zona central del cuerpo comenzaron a organizarse, iniciando la formación de las rosetas (Fig. 4.13 EB (D11)).

Las rosetas estaban compuestas por células alargadas agrupadas en torno a un centro, formando una especie de rosco. Las células que compusieron estas rosetas acabaron teniendo un crecimiento tridimensional, dando volumen a las mismas (Fig. 4.13 EB (D20)).



**Figura 4.13.- Proceso de formación de las rosetas.** EB (D7): cuerpo adherido a la placa y generación de monocapa de células a su alrededor. EB (D11 y D20): Rosetas (flechas negras) en la parte central del cuerpo embriode. Amplificación x10.

Hay protocolos como Koch et al. 2009 (32) y Falk et al. 2012 (33), donde no se utiliza FGF2, a diferencia de otros como Zhang et al. 2001 (55). Para comprobar si la presencia de FGF2 tiene un efecto sobre la inducción neuronal y, por tanto, la formación de rosetas, se estudió el número de EBs que generaron estas estructuras, en ausencia o presencia de 10 ng/ml de FGF2 en el medio ITSFN. La proporción de EBs con rosetas se calculó contando aquellos EBs donde se formaron estas estructuras respecto a los que se sembraron. Sin FGF2, tan solo un 22% de los cuerpos sembrados formaron rosetas respecto al 43% en presencia de 10 ng/ml de FGF2 (Fig. 4.14).

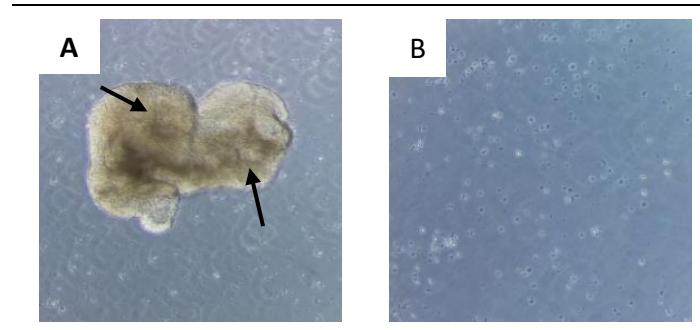


**Figura 4.14.- Efectos de FGF2 sobre la formación de rosetas.** Cuantificación del número de EBs con rosetas respecto al total de EBs que se sembraron, en la primera ronda de selección de rosetas (15 días, D15). Datos procedentes de la media de 3 ensayos, con su correspondiente desviación estándar como error. p.valor= 0.006 (t-student).

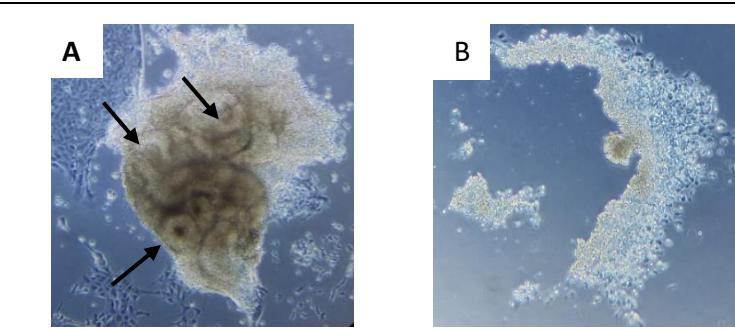
### 4.3.2. Selección de las rosetas

En torno a los 10 días de cultivo de los EBs en el medio ITS FN (día 15 del protocolo, D15), se seleccionaron las rosetas. Se probaron dos estrategias para obtenerlas, el método mecánico y el enzimático.

Para el método mecánico se usó una punta de micropipeta P200 que rascó a ciegas los cuerpos que contenían rosetas y habían sido marcados en el exterior de la placa previamente con ayuda de un microscopio. Al no poder controlar realmente lo que se está levantando, este método produjo una contaminación con otros tipos celulares. No se aislaron las rosetas únicamente, sino que, por la morfología amorfa y variación de la tonalidad del agregado, se levantó más bien todo el cuerpo embriode (Fig. 4.15). Por ese motivo, se decidió probar el reactivo *STEMdiff™ Neural Rosette Selection Reagent*. Este reactivo permitió un aislamiento más específico de la región del cuerpo donde se encontraban las rosetas, evitando la contaminación con células no deseadas al dejarlas adheridas a la placa (Fig. 4.16). Así, se consideró preferible su uso de cara a obtener poblaciones más puras.



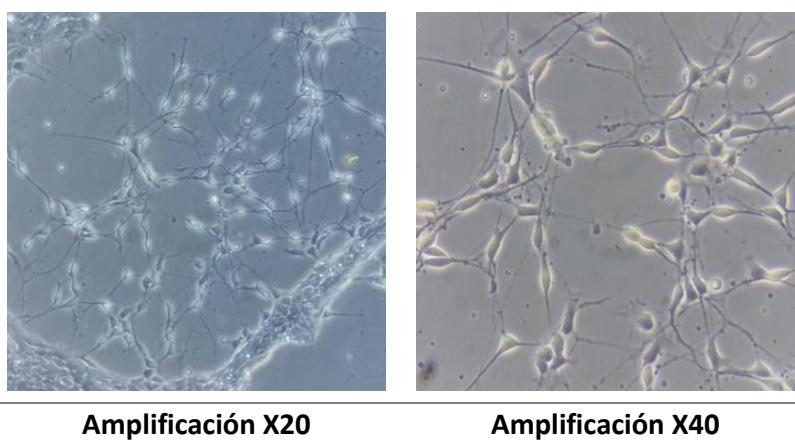
**Figura 4.15.- Producto del aislamiento mecánico de las rosetas y su posterior tripsinización.** A) Agregado celular tras el aislamiento mecánico de las rosetas y su mantenimiento un día en suspensión. Restos de rosetas en el interior (flechas negras). B) Resultado de la tripsinización de los agregados. Amplificación x10.



**Figura 4.16.- Aislamiento enzimático de las rosetas con el reactivo *STEMdiff™ Neural Rosette Selection Reagent*.** A) Cuerpos plaqueados en el día 15 con rosetas (flechas negras). B) Restos de células que quedan en la placa tras la selección de las rosetas con el reactivo de selección. Amplificación X10.

Los distintos métodos utilizados no fueron destructivos y no afectaron a la viabilidad celular. Así, tras el aislamiento de las rosetas, se mantuvo el resto de células en cultivo. Cuerpos que no presentaron rosetas en el primer aislamiento las generaron con el tiempo (Fig. 4.13 EB (D20)).

El mantenimiento de algunos EBs en el medio ITSFN, sin la adición del factor de crecimiento FGF2 tras el aislamiento de las rosetas, produjo la aparición de unas células que, morfológicamente, se asemejaban a las neuronas. Se observaron células con un soma o cuerpo neuronal iluminado, del que partían unos axones delgados que conectaban unas con otras (Fig. 4.17).



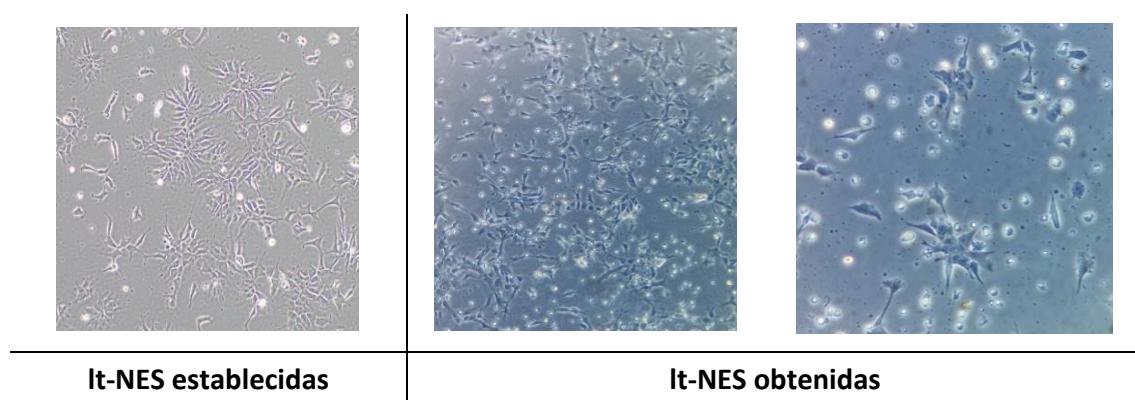
**Figura 4.17.- Imagen de algunas neuronas en los cultivos de EBs plaqueados.** Neuronas obtenidas a partir de los cuerpos embrioides plaqueados en medio ITSFN y sin factor de crecimiento FGF2 durante 5 días. Imágenes tomadas en el día 23 de una de las tandas de diferenciación.

### 4.3.3. Obtención de las células It-NES

Tras el aislamiento de las rosetas, se llevó a cabo el establecimiento de la línea de precursores neuronales It-NES. Al principio se probó su obtención siguiendo el protocolo de Koch et al. 2009 (32), que incluye un paso previo de formación de neuroesferas. Las rosetas se aislaron, se mantuvieron en suspensión en el medio Básico con 20 ng/ml de FGF2 y, tras 24 horas, se trisnizaron y sembraron. Las neuroesferas que se obtuvieron, por su cambio de coloración, con regiones más oscuras que otras, y su morfología amorfada y poco esferoidal, parecieron más restos de EBs que neuroesferas (Fig. 4.15A). Tras trisnizar y sembrar estos agregados, las células no sobrevivieron (Fig. 4.15B).

Posteriormente, se intentó conseguir la población celular siguiendo el protocolo del reactivo *STEMdiff™ Neural Rosette Selection Reagent*. Las rosetas aisladas fueron directamente sembradas a alta densidad. En este caso, se observaron restos de agregados celulares, que, con el tiempo y el pase de las células, desaparecieron. Así, se consiguió una población que, a nivel morfológico, se asemejó a la que se quería obtener (Fig. 4.18).

La organización de las células It-NES obtenidas formando rosetas no estuvo tan definida como en las It-NES ya establecidas, pero tendieron a crecer formando como agregados (Fig. 4.18).

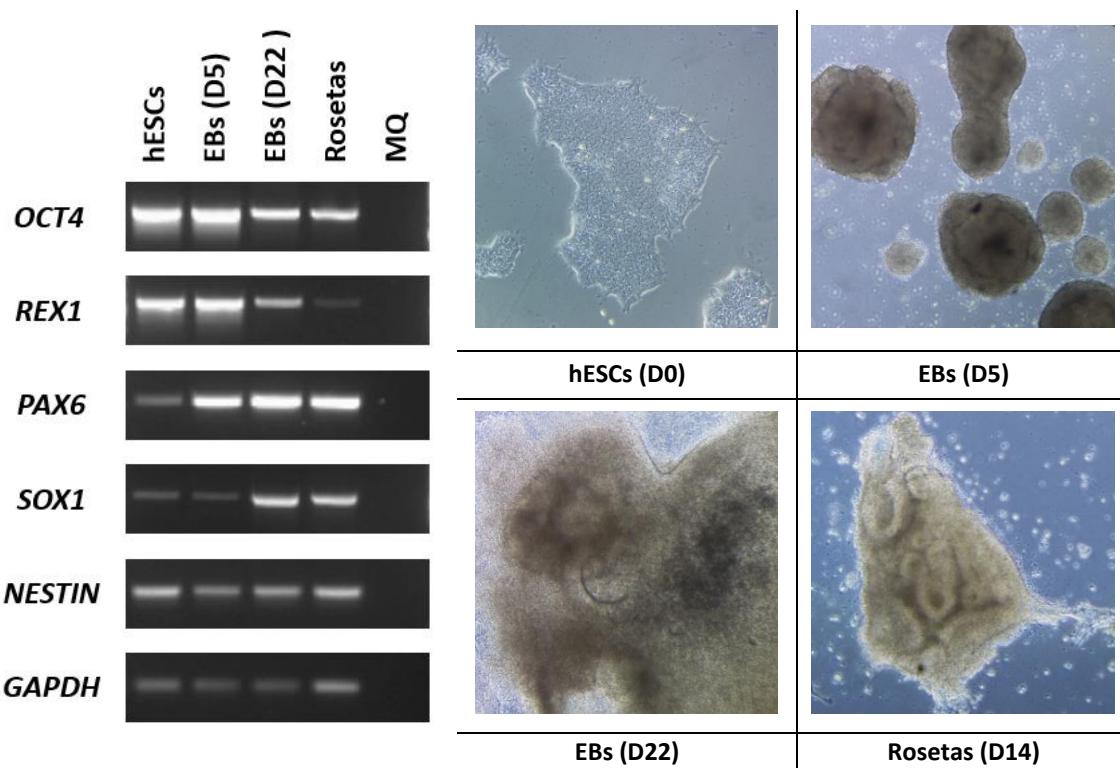


**Figura 4.18.- Comparación morfológica entre las células It-NES ya establecidas y células It-NES obtenidas.** Las células obtenidas (It-NES obtenidas) crecieron agrupándose formando una estructura similar a las rosetas. La imagen de las It-NES ya establecidas proviene de células en cultivo del grupo de Z.Kokaia, utilizadas en artículos como Tornero et al. 2013 (56).

#### 4.3.4. Seguimiento del protocolo de diferenciación

Con el objetivo de comprobar si el proceso de diferenciación estaba funcionando se realizaron una serie de análisis. Además del seguimiento morfológico, ya indicado en los apartados anteriores, se realizaron estudios de expresión génica en los puntos que se consideraron claves del protocolo. Previamente, se pusieron a punto dichos ensayos y se determinó la Tm de los *primers* (60°C) y la concentración de Mg<sup>2+</sup> necesaria (1,5 mM).

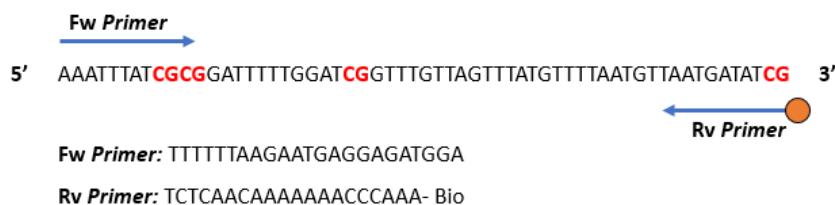
Para los marcadores de pluripotencia OCT4 y REX1, se obtuvo un amplicón del tamaño esperado (573 y 420 pb, respectivamente) en hESCs, EBs (D5), EBs (D22) y rosetas, con una disminución de la intensidad en los dos últimos casos, lo que indicó una disminución de la expresión. La intensidad del producto de amplificación en EBs (D22) y rosetas fue mayor en *OCT4* que en *REX1*. En el caso de los marcadores de precursores neuroepiteliales PAX6, SOX1 y NESTIN, se observaron productos del tamaño esperado (207, 464 y 143 pb) en todos los tipos celulares. La intensidad de la banda fue en aumento en el caso de SOX1 y PAX6 mientras se avanzaba en el proceso de diferenciación. En el caso de NESTIN, la intensidad apenas se modificó entre las diferentes muestras analizadas (Fig. 4.19).



**Figura 4.19.- Estudio de expresión de *OCT4*, *REX1*, *PAX6*, *SOX1* y *NESTIN* en los estadios claves del protocolo de diferenciación: hESCs, EBs de 5 días, EBs con rosetas de 22 días y rosetas aisladas. A la derecha, imágenes del cultivo celular al que corresponde el cDNA que se usó en el estudio de expresión.**  
Amplificación de las imágenes x10.

#### 4.4. Niveles de metilación de HERV-W/MSRV en el cromosoma 19

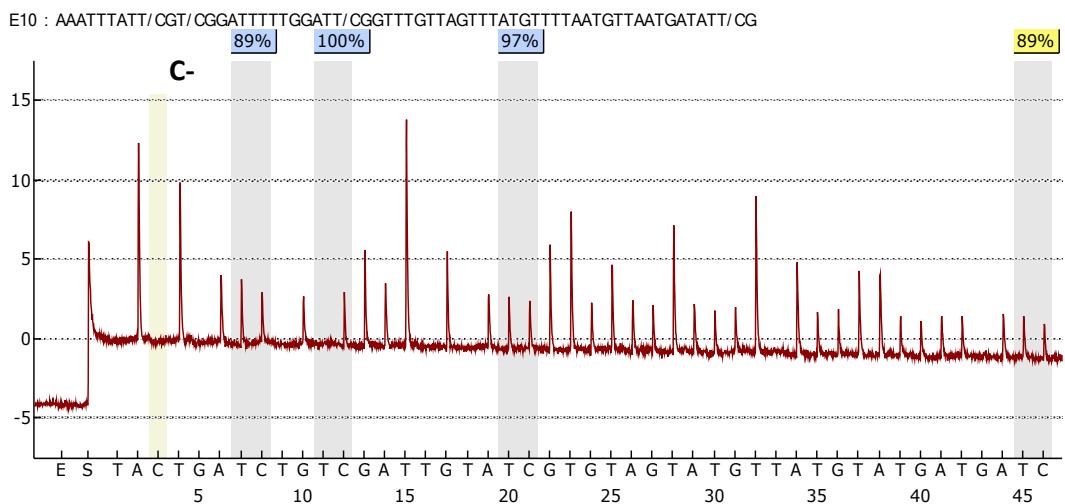
Para analizar el grado de metilación de una de las copias de HERV-W/MSRV en el cromosoma 19, fue necesaria la preparación del material genético tratado con bisulfito usando la técnica de PCR y unos *primers* diseñados con anterioridad (Fig. 4.20). Dichos *primers* amplificaron un fragmento de la región ENV.



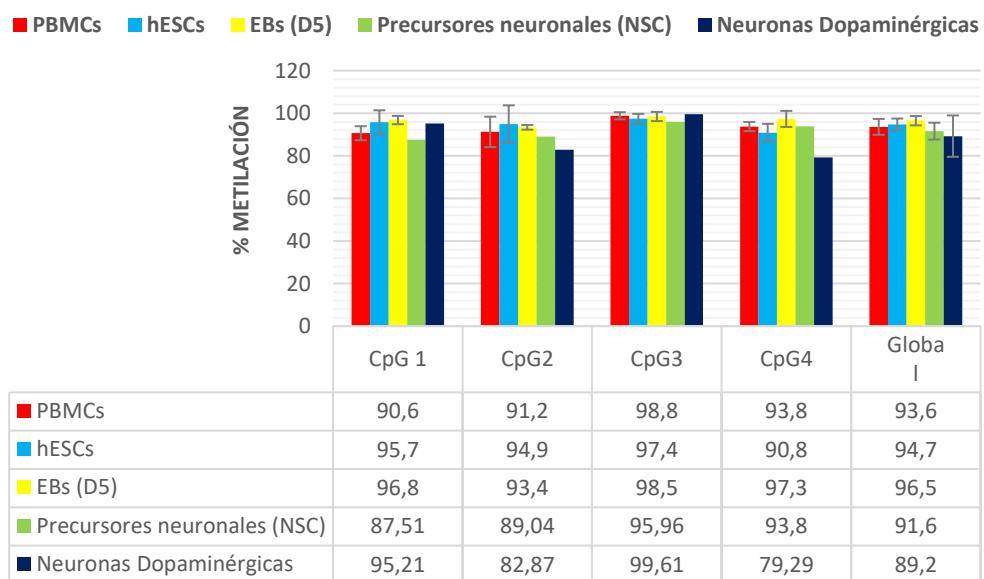
**Figura 4.20.- Secuencia tratada con bisulfito amplificada por los *primers* diseñados (Forward Primer: FW Primer y Reverse Primer: Rv Primer).** En rojo y negrita se representan los 4 dinucleótidos CpG de los que se va a analizar su metilación por pirosecuenciación. *Primers* diseñados en la región ENV. El primer reverso contiene una cola de biotina (círculo naranja).

La visualización de los productos de amplificación de PCR se realizó siempre antes de la secuenciación, para comprobar que la reacción había tenido lugar y había suficiente material para poder secuenciar. El producto amplificado por PCR contenía 4 dinucleótidos CpG (Fig 4.20), de los que se analizó su grado de metilación por pirosecuenciación. Tras tratar el DNA genómico con bisulfito, las citosinas no protegidas por metilación se convirtieron en uracilos y se secuenciaron como timinas. Las citosinas metiladas en C5, que se encuentran formando parte de los dinucleótidos CpG, no se vieron modificadas y se secuencian como citosinas. A partir de esta base teórica, el programa de pirosecuenciación Pyro Q-CpG 1.0.9 determinó el porcentaje de metilación de cada CpG dividiendo la incorporación de las citosinas frente a las citosinas y timinas ( $\%C = C/C+T$ ). Los datos se dieron en forma de pirograma (Fig. 4.21).

La representación de los datos obtenidos de los diferentes pirogramas en gráficos (Fig. 4.22), permitió la comparación entre las muestras analizadas: PBMCs, hESCs, cuerpos embrioides en día 5 (EBs D5), precursores neuronales (NSC) y neuronas dopaminérgicas (Ver Materiales y Métodos). Los niveles de metilación fueron muy similares, superiores en la mayoría de los casos al 90% de metilación. Se encontraron valores inferiores en CpG1 de NSC (87,51%), CpG2 de NSC (89,04%) y neuronas dopaminérgicas (82,87%) y CpG4 de neuronas dopaminérgicas (79,29%). A nivel global, teniendo en cuenta la metilación media de las 4 CpGs, todos los tipos celulares presentaron hipermetilación, con unos valores entorno al 90%.



**Figura 4.21.- Pirograma obtenido de una de las muestras de PBMCs secuenciadas.** En la parte superior se encuentra la secuencia a analizar, reflejando la posibilidad de secuenciar citosinas o timinas (C/T). Los recuadros con los porcentajes indican el grado de metilación y la calidad con la que han pasado el ensayo según la coloración (Azul: bien y amarillo: necesidad de revisión por el técnico). Los picos se corresponden a la señal luminosa que recoge la máquina, proporcional al número de nucleótidos incorporados en la secuencia. En la parte inferior se encuentra el orden de dispensación de los nucleótidos. Se suele incorporar un nucleótido extra (C de coloración más grisácea) como control negativo interno (C-).



**Figura 4.22.- Grado de metilación de una copia de HERV-W/MSRV en el cromosoma 19.** Análisis de la metilación de cada una de las 4 CpGs y a nivel global, media de las 4 CpGs. Muestras analizadas: PBMCs, hESCs, EBs en día 5, precursores neuronales (NSC) y neuronas dopaminérgicas. Los datos de las 4 CpGs representan la media de varias mediciones del mismo ensayo, con su correspondiente desviación estándar. En el caso de los precursores neuronales y neuronas dopaminérgicas sólo se realizó una medición.

## 5. DISCUSIÓN

---

### 5.1. Acondicionamiento de las células ES [4]

En el acondicionamiento de las células ES [4] se logró sustituir el 75% del medio comercial mTeSR™1 por MEFCM sin perder la viabilidad celular ni la expresión de marcadores de pluripotencia (Fig. 4.7). Las hESCs se han cultivado tradicionalmente en este tipo de medio condicionado, tal y como se recoge en Gerrard et al. 2005 (36). La imposibilidad de adaptación completa de las células se pudo deber a que el medio MEFCM requería algún componente adicional, cuya ausencia no fue compensada al eliminar el medio mTeSR™1.

El análisis de especificidad de los *primers* para *OCT4* reflejó un problema frecuente que encuentran otros investigadores. Se obtuvo producto de amplificación en ambos controles negativos, tanto en placenta como en PBMCs (Fig. 4.6A). *OCT4* codifica para un factor transcripcional que juega un papel fundamental en el mantenimiento de la pluripotencia y la capacidad proliferativa de las hESCs (57). No obstante, su uso como marcador de pluripotencia se ha visto comprometido al encontrarse expresión en células diferenciadas, como es el caso de las PBMCs (58,59). Es importante distinguir en los estudios entre las dos isoformas que codifica el gen, OCT4A y OCT4B, ya que únicamente OCT4A tiene un papel en el mantenimiento de la pluripotencia. La gran homología entre las isoformas y pseudogenes de *OCT4*, dificulta el diseño de *primers* que eviten confusiones y falsos positivos (60). Por este motivo, en los últimos años, el estudio de *OCT4* no se suele considerar suficiente para determinar que una célula es pluripotente y se requieren otros marcadores, como REX1 (58). El análisis de especificidad de los *primers* para *REX1* mostró una débil banda de amplificación en el control negativo de placenta (Fig. 4.6B). A nivel murino, REX1 se expresa en determinadas zonas, ejerciendo un papel importante en la supervivencia del embrión (61). Para el ser humano, se requerirían más estudios que demostraran si REX1 se expresa o no y la función que ejercería.

El estudio del mantenimiento de la pluripotencia de las células en las diferentes fases del proceso de adaptación se realizó por PCR (Fig. 4.7). Otro test rutinario que existe para comprobar la pluripotencia de las hESCs es la formación de EBs, que son además el primer paso de muchos protocolos de diferenciación (48). De esta forma, se habría comprobado si las células adaptadas seguían siendo pluripotentes y si además eran capaces de usarse en protocolos de diferenciación.

El acondicionamiento de las células logró reducir el uso del medio comercial mTeSR™1, pero también disminuyó la tasa de crecimiento de las hESCs. Esto supone un incremento del tiempo necesario para obtener la cantidad suficiente de células para llevar a cabo los protocolos de diferenciación, pudiendo llegar a ser un problema. Además, el medio MEFCM, requiere una preparación previa, que también consume tiempo.

Por otro lado, se están tratando de estandarizar los protocolos, para lo que es necesario reducir la variabilidad existente en los diferentes lotes de suero y fibroblastos usados en el cultivo tradicional de las células madre (26). Por ese motivo, en los últimos años, se han desarrollado medios químicamente definidos como mTeSR™1 y matrices especiales como Matrigel. La sustitución del medio mTeSR™1 por MEFCM pudo reducir los costes, pero introdujo una fuente de variabilidad que dificulta la estandarización de los protocolos. Por todo ello, a pesar de haber conseguido reducir el uso de mTeSR™1 en el mantenimiento de las hESCs, cabe preguntarse si para determinados experimentos, especialmente aquellos que necesitan gran cantidad de células, merece la pena.

Finalmente, se están desarrollando nuevos medios mejorados, como es el caso de *StemFlex™ Medium* de Thermo Fisher (A3349401), que sería interesante testar en estas células para ver los efectos que tiene sobre ellas.

## 5.2. Puesta a punto del ensayo de citometría

La intención inespecífica de NANOG (Fig. 4.9) invalidó su uso. De cara a utilizar un nuevo anticuerpo, se podría probar uno de otra casa comercial como Abcam (ab109250) o Santa Cruz (sc-293121), para ver si son más específicos. Otros anticuerpos distintos a  $\alpha$ NANOG que se podrían testar serían  $\alpha$ REX1 y  $\alpha$ SOX2. SOX2 es un factor de transcripción que forma parte, junto con OCT4 y NANOG, de la principal red de factores de transcripción que interviene en la regulación de la pluripotencia, compartiendo muchos de sus genes diana (30). REX1 también es un factor de transcripción que se emplea como marcador de pluripotencia (29). Dado que el anticuerpo que ha fallado,  $\alpha$ NANOG, es también un marcador de pluripotencia,  $\alpha$ REX1 y  $\alpha$ SOX2 podrían ser buenos sustitutos.

A la hora de realizar los ensayos de citometría, uno de los principales problemas que se tuvo fue la distinción de las células vivas de las muertas. La selección de las células vivas es importante ya que en ocasiones los anticuerpos pueden dar mayor fluorescencia en las células muertas al acumularse en ellas, alterando los resultados obtenidos. En los experimentos de citometría se utilizó para distinguir las células muertas el reactivo SYTOX de Thermo Fisher (Ver Materiales y Métodos). El problema de este reactivo es que no aguanta la fijación de las células, por lo que su fluorescencia se pierde en los marcas intracelulares, no pudiendo distinguir células muertas de vivas. Esto es lo que ocurrió en el estudio de OCT4 y NANOG, que pudo afectar a los resultados obtenidos, al no haber podido distinguir las diferentes poblaciones. Para solucionar este problema, se podrían usar otros reactivos que aguantan la fijación como *Live/Dead Fixable Dead Cells Stain* de Thermo Fisher.

### 5.3. Establecimiento de la línea de precursores neuronales

El protocolo que se usó (Koch et al. 2009 (32)) generó, a partir de hESCs, células capaces de proliferar indefinidamente con propiedades neurogénicas estables a lo largo del tiempo, los precursores neuronales denominados It-NES. Estas células, por los marcadores que las caracterizan (SOX1, PAX6, NESTIN), representan un estadio temprano del desarrollo del sistema nervioso central. Por ese motivo, son una herramienta muy buena en el estudio de transmisiones sinápticas entre neuronas y enfermedades neurodegenerativas, siendo la esclerosis múltiple una de ellas (33).

El proceso de diferenciación se basó en la formación de EBs. Los cuerpos se tenían que mantener en suspensión en el medio EB. Al principio, se usó un medio que contenía suero y KO-DMEM (medio EB (1)). El bajo rendimiento en la obtención de rosetas, que son las primeras indicadoras de inducción neuronal, hizo que se cambiara este medio por el medio EB (2). Con las nuevas condiciones sí que se obtuvieron rosetas (Fig. 4.12). La diferencia en su composición (Fig. 4.12) demostró que, la presencia de suero fetal bovino afectó negativamente al proceso de diferenciación. Zhang et al. 2001 (55) ya recomendó usarlo lo mínimo posible, al ser contraproducente en la diferenciación. Además, proponía su uso, como caso extremo, si había problemas en la adherencia de los EBs al sembrarlos. Esto último, respaldó la posible implicación del suero en la adhesión de los cuerpos a las placas Petri mientras se tenían que mantener en suspensión y que fue contraproducente para la diferenciación.

El uso del nuevo medio EB (EB (2)), dificultó la adhesión de los cuerpos al sembrarlos y fue necesaria la utilización, no solo de Poli-L-ornitina, sino también Laminina (Ver Materiales y métodos). La laminina es una glicoproteína implicada en numerosas funciones, como la adhesión, supervivencia o desarrollo (62). Esta glicoproteína probablemente favoreció, junto con el cambio de medio, a la formación de rosetas. Estudios han demostrado que, el cambio del tipo de laminina empleada para generar las superficies de cultivo puede afectar al fenotipo y capacidad de diferenciación de las células (datos no publicados). Estos ensayos refuerzan la idea de que la laminina también pudo ejercer, junto con el medio EB (2), un efecto positivo en el protocolo de diferenciación, estimulando la aparición de las rosetas.

Además de potenciarse la inducción neuronal, con el cambio al medio EB (2) los cuerpos sobrevivieron durante más tiempo sin adherirse a la placa y presentaron buen estado, lo que permitió incrementar el tiempo en el que se mantuvieron en suspensión (hasta el 5 día). Esto fue importante ya que, en el protocolo de Falk et al. 2012 (33), que se basa en Koch et al. 2009 (32), se recomienda sembrar EBs de más de 4 días, que hayan estado en ausencia de FGF2 para favorecer su diferenciación.

El efecto positivo de la suplementación de FGF2 al medio ITSFN en la formación de rosetas (Fig. 4.14) fue respaldado por los estudios de Zhang et al. 2001 (55), donde la ausencia de FGF2 dificultó la correcta organización de las células para formar rosetas. Así, a pesar de no utilizar este factor el protocolo de diferenciación base (Koch et al. 2009), se decidió usar para estimular la diferenciación neuronal, la supervivencia y proliferación de los precursores neuronales tempranos.

Durante el proceso de diferenciación se observó que no todos los cuerpos formaban rosetas al mismo tiempo (Fig. 4.13). El hecho de que no todos los cuerpos se encuentren en el mismo estadio de diferenciación y algunos de ellos requieran más tiempo para formar rosetas podría explicarse por las diferencias de tamaño. El tamaño de los cuerpos afecta a la velocidad de difusión de los diferentes compuestos que participan en la diferenciación, llegando a diferentes concentraciones a su interior, impidiendo la simultaneidad del proceso de diferenciación (63). Tras la realización del protocolo repetidas veces se observó que, el tamaño de los EBs era importante para formar las rosetas. Los cuerpos pequeños, al ser sembrados, regeneraron las colonias ES y acabaron muriendo sin formar rosetas. Con los métodos que se usaron, los EBs se formaron aleatoriamente y no se pudo controlar su tamaño. Así, se obtuvo una gran heterogeneidad de forma, tamaño e incluso agregados de EBs. Para poder estandarizar el tamaño de los cuerpos y sincronizarlos para formar rosetas, una alternativa futura interesante en la formación de los EBs sería el uso de *Aggrewell dishes*. Con este sistema, las células disociadas se incorporan en unos micropocillos donde la densidad celular determina el tamaño de los cuerpos (48).

La eficiencia de la diferenciación neuronal es baja en comparación con otras como la hematopoyética o mesenquimal. Para incrementar el rendimiento de la diferenciación se podrían usar ciertos compuestos químicos como *Noggin*. Esta molécula bloquea BMP (*Bone Morphogenetic Protein*), incrementando la inducción neuronal y, por tanto, la formación de rosetas (64). Sería interesante en un futuro ver si la adición de este tipo de compuestos permite la obtención de rosetas en menor tiempo y con un fenotipo neuronal más marcado.

Una vez formadas las rosetas, y tras probar el protocolo mecánico y enzimático, se decidió usar el reactivo *STEMdiff™ Neural Rosette Selection Reagent* para aislarlas, al dejar las células contaminantes adheridas a la placa (Fig. 4.16). En otros protocolos como Falk et al. 2012 (33) se prefiere el aislamiento mecánico con un escarpelo de la zona con rosetas escogida en el microscopio. Este método incrementa la pureza de la población obtenida y es mejor que otros sistemas enzimáticos como la dispasa, donde hay que jugar con el tiempo de incubación para evitar la contaminación con otros tipos celulares (55). La imposibilidad de visualizar los cuerpos al microscopio y usar un escarpelo para seleccionar las rosetas, manteniendo las condiciones de esterilidad, hizo que se optara finalmente por el uso de este reactivo *STEMdiff™ Neural Rosette Selection Reagent*.

A partir de las rosetas se estableció la línea de precursores neuronales It-NES. Se probaron dos protocolos para su obtención. Uno de ellos consistió en la formación previa de neuroesferas (32). La falta de viabilidad de las células que conformaban la neuroesfera tras su tripsinización (Fig. 4.15B) posiblemente se debió a la necesidad de una mayor densidad celular en el cultivo. Se ha visto que es esencial para la supervivencia una densidad celular alta, especialmente durante los primeros días (32,33). Otra posibilidad pudo ser que el tratamiento de disociación con tripsina (Sigma-Aldrich, 0.025%) dañó a las células, provocando su muerte. Con el método alternativo, la siembra directa de las rosetas obtenidas, se pudo conseguir un cultivo que se asemejó mucho morfológicamente a las células It-NES ya establecidas (Fig. 4.18). Posiblemente las células obtenidas requieran más tiempo para establecerse y organizarse en rosetas más definidas. Además del análisis a nivel morfológico, faltaría comprobar la expresión de marcadores característicos de estas células, tanto neuroepiteliales (PAX6, SOX1, NESTIN), como implicados en la formación de las rosetas (ZO1). De esa forma se aseguraría que las células cumplen con el fenotipo a nivel morfológico y de marcadores. También habría que comprobar si son capaces de proliferar durante largos períodos de tiempo sin diferenciarse, tal y como se indica en Falk et al. 2012 (33).

Durante la diferenciación, se comprobó la expresión de una serie de marcadores por PCR. La reducción de la expresión de los marcadores de pluripotencia se unió al aumento de la expresión de PAX6 y SOX1, marcadores de precursores neuronales (Fig. 4.19). La reducción de la expresión de OCT4 durante la diferenciación no fue tan acusada como en REX1. Esto se pudo deber a que este factor de transcripción participa en la estimulación de la diferenciación neuronal en el proceso de neurogénesis (65). La tendencia de los niveles de expresión de los distintos marcadores coincidió con los obtenidos por Gerrard et al. 2005 (36). Estos resultados dan una idea acerca de la expresión, pero no permiten una cuantificación precisa debido a la baja sensibilidad y a que la amplificación exponencial del DNA ya ha terminado cuando la banda es detectada. Por ello, si se quisieran conocer pequeñas diferencias o cuantificar los niveles de expresión, sería necesario realizar un ensayo de qPCR, que es mucho más preciso. En estudios futuros, sería interesante repetir los análisis para comprobar que la expresión se mantiene y estudiar la posible variabilidad entre unas tandas de diferenciación y otras. También sería bueno complementar los resultados con ensayos de inmunohistoquímica, que permiten, además de mostrar si hay expresión génica que da lugar a proteína, localizarla a nivel celular, consiguiendo más información.

En un futuro, se quiere diferenciar los precursores neuronales obtenidos a los tipos neuronales deseados, con protocolos como los que se encuentran en Oki et al. 2012 (66). Durante el establecimiento de los precursores neuronales se obtuvieron neuronas (Fig. 4.17), pero su diferenciación se produjo al azar, no pudiendo controlar los fenotipos obtenidos, que son importantes de cara a realizar los estudios.

El proceso de diferenciación se basó en el uso de EBs. Los protocolos basados en EBs presentan un problema y es que el proceso es muy heterogéneo (37). Por ese motivo, en los últimos años se está tratando de solucionarlo introduciendo kits como *PSC Neural Induction Medium* de Thermo Fisher, que permite la obtención de precursores neuronales en una semana, sin la necesidad de formación de cuerpos embrioides. Se reduce considerablemente el tiempo invertido, pero incrementan los costes. Una botella de 500 ml cuesta 361 euros, y se requieren más reactivos, muchos de los cuales son necesarios para el mantenimiento y congelación de las células obtenidas.

Tras optimizar el protocolo de diferenciación en las hESCs, sería interesante trasladarlo a las iPSCs, como ya se ha realizado en artículos como Tornero et al. 2013 (56). Las células IPS se pueden conseguir a partir de la reprogramación de células somáticas, como los fibroblastos de piel de adulto, a través de la integración de una serie de factores como son OCT3/4, SOX2, KLF4 y C-MYC. Estas células son muy similares a las ES y son capaces de diferenciarse a los diferentes tipos celulares de las 3 capas embrionarias (67). Su generación a partir de células de pacientes, unido a sus propiedades, las hace una buena fuente para la obtención de modelos celulares de estudio de patologías, encontrando una cierta correlación entre la historia clínica y el fenotipo celular (25). Por ese motivo, sería interesante generar, a partir de iPSCs de pacientes de esclerosis múltiple, precursores neuronales que permitieran aumentar el conocimiento acerca de la patología de la enfermedad y la posible implicación de los retrovirus endógenos en ella. Hoy en día, se está avanzando en este ámbito y ya existe una línea iPSCs de enfermos de EM que se ha logrado diferenciar a neuronas con el objetivo de estudiar la enfermedad (39).

Además de para investigar, las células obtenidas de la diferenciación de las iPSCS se podrían usar en terapia celular, reduciendo el rechazo, al derivar del propio paciente. Esta es una de las ventajas que tienen las iPSCs frente a las hESCs. Se están impulsando actualmente 3 formas de terapia celular. Las dos primeras son terapias de reemplazo, donde se tratan de sustituir los oligodendrocitos dañados o el sistema inmune defectuoso del paciente. La tercera estrategia intenta conseguir que las células madre endógenas del paciente se movilicen y actúen beneficiosamente en la zona dañada. Estas terapias celulares se presentan como un tratamiento prometedor para las formas progresivas de la esclerosis múltiple, donde los fármacos utilizados habitualmente no suelen tener éxito (68).

## 5.4. Niveles de metilación de HERV-W/MSRV

Los *primers* para estudiar los niveles de metilación de HERV-W/MSRV se diseñaron para amplificar una zona de la región *ENV* (Fig. 4.20). Sería interesante analizar la metilación de la región LTR al actuar como promotor y controlar la expresión (12), pero estas secuencias son muy similares entre sí y no permiten el diseño específico de ensayos que identifiquen los distintos tipos de HERV-W (22).

Para confirmar los resultados de metilación (Fig.4.22) y poder determinar si las pequeñas diferencias son significativas, sería necesario repetir el experimento, con al menos tres réplicas técnicas, utilizando muestras de gDNA extraído y convertido con bisulfito de diferentes días, pudiendo hacer así un tratamiento estadístico más completo de los datos. Además, sería interesante estudiar por qPCR la expresión de HERV-W/MSRV para ver si hay diferencias entre las distintas poblaciones celulares o existe algún nexo con metilación.

En condiciones no patológicas, como las que se están analizando, lo normal es que los retrovirus endógenos no se expresen, bien porque sus copias son defectuosas, o bien porque están silenciados genéticamente, con una hipermetilación del DNA (11), lo que coincidiría con los resultados obtenidos (Fig.4.22). Ante determinadas condiciones patológicas, como el incremento de citoquinas proinflamatorias, se ha observado que disminuye el reclutamiento de reguladores epigenéticos que se encargan del silenciamiento de determinados genes, lo que lleva a una hipometilación e incremento de su expresión (14). La expresión de HERVs también se ha visto incrementada en presencia del virus Ebstein-Barr, que es uno de los factores que interviene en la etiología de la esclerosis múltiple (21). Por ello, sería interesante analizar en un futuro, en células infectadas con este virus o en aquellas en las que se haya conseguido una alteración de los niveles de citoquinas proinflamatorias, un análisis de los niveles de metilación y expresión, al estar simulando algunas de las condiciones patológicas que se dan en EM. En última instancia, será interesante realizar estudios comparativos entre las iPSCs de pacientes y controles, para ver si existen diferencias entre ellos.

## 6. CONCLUSIONES

---

El trabajo desarrollado ha permitido extraer las siguientes conclusiones.

En el proceso de adaptación de las hESCs a MEFCM:

- I. El 75% del medio comercial mTeSR™1 se logró sustituir satisfactoriamente por MEFCM sin perder la viabilidad celular ni la expresión de marcadores de pluripotencia.
- II. El cambio morfológico de las células no se debió a que se estuvieran diferenciando.

Durante la diferenciación de las hESCs a precursores neuronales It-NES:

- III. El mejor método para generar EBs fue disgregar las hESCs con Acutasa.
- IV. La eliminación del suero fetal bovino fue esencial para la formación de las rosetas.
- V. FGF2 en el medio ITSFN incrementó la proporción de EBs con rosetas.
- VI. El reactivo *STEMdiff™ Neural Rosette Selection Reagent* y su protocolo fue el mejor para seleccionar las rosetas y establecer las células It-NES.

Respecto a los niveles de metilación de HERV-W/MSRV:

- VII. Los niveles de metilación en todos los tipos celulares analizados (hESCs, EBs (D5), precursores neuronales (NSC) y neuronas dopaminérgicas) fueron muy similares y superiores al 80%.

## 6. CONCLUSIONS

---

The following conclusions were drawn based on results described in this TFM:

In the adaptation process of hESCs to MEFCM:

- I. 75% of the commercial media mTeSR™1 was successfully replaced by MEFCM without losing cell viability and pluripotency markers' expression.
- II. The morphological change of the cells was not due to a differentiation process.

During the differentiation of hESCs to long term neuroepithelial stem cells:

- III. The best method to obtain EBs was Acutase.
- IV. The withdrawal of fetal bovine serum was essential to obtain rosettes.
- V. FGF2 in ITSFN media increased the number of EBs with rosettes.
- VI. *STEMdiff™ Neural Rosette Selection Reagent* and its protocol were the best to obtain the rosettes and the It-NES cells.

With respect to the methylation studies of HERV-W/MSRV:

- VII. Methylation levels were similar between the cells analyzed (hESCs, EBs (D5), neuronal stem cells and dopaminergic neurons) and higher than 80%.

## BIBLIOGRAFÍA

---

1. Küçükali C, Kurtüncü M, Çoban A, Çebi M, Tüzün E. Epigenetics of multiple sclerosis: an updated review. *Neuromolecular medicine*. 2015. p. 83–96.
2. Yao B, Christian KM, He C, Jin P, Ming G, Song H. Epigenetic mechanisms in neurogenesis. *Nat Rev Neurosci*. Nature Publishing Group; 2016;17(9):537–49.
3. Morandi E, Tarlinton RE, Gran B. Multiple sclerosis between genetics and infections: Human endogenous retroviruses in monocytes and macrophages. *Front Immunol*. 2015;6(DEC):1–6.
4. Goldenberg MM. Multiple sclerosis review. *P T*. 2012;37(3):175–84.
5. 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;11(5):570–88.
6. Vidal-Jordana A, Montalban X. Multiple Sclerosis: Epidemiologic, Clinical and Therapeutic Aspects. *Neuroimaging Clin NA*. Elsevier Inc; 2017;27(2):195–204.
7. De Lorenzo-Pinto A, Rodríguez-González CG, Ais-Larisgoitia A. Nuevos tratamientos para la esclerosis múltiple. *Med Clin (Barc)*. 2013;140(2):76–82.
8. Nissen KK, Laska MJ, Hansen B, Terkelsen T, Villesen P, Bahrami S, et al. Endogenous retroviruses and multiple sclerosis-new pieces to the puzzle. *BMC Neurol*. 2013;13:111.
9. Tao C, Simpson S, Taylor B V, van der Mei I. Association between human herpesvirus & human endogenous retrovirus and MS onset & progression. *Journal of the Neurological Sciences*. Elsevier B.V.; 2017. p. 239–49.
10. Grandi N, Tramontano E. Type W Human Endogenous Retroviruses (HERV-W) proviral integrations and their mobilization by L1 machinery: contribution to the human transcriptome and impact on the host physio-pathology. *Viruses*. 2017;accepted:1–36.
11. Perron H, Lang A. The human endogenous retrovirus link between genes and environment in multiple sclerosis and in multifactorial diseases associating neuroinflammation. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*. 2010. p. 51–61.
12. Li F, Karlsson H. Expression and regulation of human endogenous retrovirus W elements. *Apmis*. 2016;124(1–2):52–66.
13. Young GR, Stoye JP, Kassiotis G. Are human endogenous retroviruses pathogenic? An approach to testing the hypothesis. *Bioessays*. 2014;35(June):794–803.
14. Christensen T. Human endogenous retroviruses in neurologic disease. *Apmis*. 2016;124(1–2):116–26.
15. Colmegna I, Garry RF. Role of Endogenous Retroviruses in Autoimmune Diseases. *Infect Dis Clin North Am*. 2006;20(4):913–29.
16. Hackett JA, Surani MA. DNA methylation dynamics during the mammalian life cycle. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2012;368(1609):20110328–20110328.
17. Gimenez J, Montgiraud C, Oriol G, Pichon JP, Ruel K, Tsatsaris V, et al. Comparative methylation of ERVWE1/syncytin-1 and other human endogenous retrovirus LTRs in placenta tissues. *DNA Res*. 2009;16(4):195–211.
18. Gimenez J, Montgiraud C, Pichon JP, Bonnaud B, Arsac M, Ruel K, et al. Custom human endogenous retroviruses dedicated microarray identifies self-induced HERV-W family elements reactivated in testicular cancer upon methylation control. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(7):2229–46.
19. Noorali S, Rotar IC, Lewis C, Pestaner JP, Pace DG, Sison A, et al. Role of HERV-W syncytin-1 in placentation and maintenance of human pregnancy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2009;17(4):319–28.
20. Dolei A, Uleri E, Ibba G, Caocci M, Piu C, Serra C. The aliens inside human DNA: HERV-W/MSRV/syncytin-1 endogenous retroviruses and neurodegeneration. *J Infect Dev Ctries*. 2015;9(6):577–87.
21. Fernández-Menéndez S, Fernández-Morán M, Fernández-Vega I, Pérez-Álvarez A, Villafani-Echazú J. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. from evidence to therapeutic strategies. *J Neurol Sci*. Elsevier B.V.; 2016;361:213–9.
22. Mameli G, Poddighe L, Astone V, Delogu G, Arru G, Sotgiu S, et al. Novel reliable real-time PCR for differential detection of MSRVenv and syncytin-1 in RNA and DNA from patients with multiple sclerosis. *J Virol Methods*. 2009;161(1):98–106.
23. Madeira A, Burgelin I, Perron H, Curtin F, Lang AB, Faucard R. MSRV envelope protein is a potent,

- endogenous and pathogenic agonist of human toll-like receptor 4: Relevance of GNbAC1 in multiple sclerosis treatment. *J Neuroimmunol.* 2016;291:29–38.
24. Kipp M, van der Star B, Vogel DYS, Puentes F, van der Valk P, Baker D, et al. Experimental in vivo and in vitro models of multiple sclerosis: EAE and beyond. *Mult Scler Relat Disord.* 2012;1(1):15–28.
  25. Koch P, Kokaia Z, Lindvall O, Brüstle O. Emerging concepts in neural stem cell research: autologous repair and cell-based disease modelling. *Lancet Neurol.* Elsevier Ltd; 2009;8(9):819–29.
  26. O'Connor MD. The 3R principle: advancing clinical application of human pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2013;4(2):21.
  27. James A. Thomson, Joseph Itskovitz-Eldor SSS, Michelle A. Waknitz, Jennifer J. Swiergiel VSM, Jones JM. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* (80- ). 1998;282(5391):1145–7.
  28. Eiselleova L, Matulka K, Kriz V, Kunova M, Schmidtova Z, Neradil J, et al. A complex role for FGF-2 in self-renewal, survival, and adhesion of human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2009;27(8):1847–57.
  29. Son MY, Choi H, Han YM, Cho YS. Unveiling the critical role of REX1 in the regulation of human stem cell pluripotency. *Stem Cells.* 2013;31(11):2374–87.
  30. Boyer LA, Tong IL, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell.* 2005;122(6):947–56.
  31. Du Z-W, Zhang S-C. Neural differentiation from embryonic stem cells: which way? *Stem Cells Dev.* 2004;13(4):372–81.
  32. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(9):3225–30.
  33. Falk A, Koch P, Kesavan J, Takashima Y, Ladewig J, Alexander M, et al. 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):1–13.
  34. Brickman JM, Serup P. Properties of embryo bodies. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2017;6(2).
  35. Roy NS, Cleren C, Singh SK, Yang L, Beal MF, Goldman SA. Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes. *Nat Med.* 2006;12(11):1259–68.
  36. Gerrard L, Rodgers L, Cui W. Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Neural Lineages in Adherent Culture by Blocking Bone Morphogenetic Protein Signaling. *Stem Cells.* 2005;23(9):1234–41.
  37. 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.
  38. Dhara SK, Stice SL. Neural differentiation of human embryonic stem cells. *J Cell Biochem.* 2008;105(3):633–40.
  39. Massa MG, Gisevius B, Hirschberg S, Hinz L, Schmidt M, Gold R, et al. Multiple sclerosis patient-specific primary neurons differentiated from urinary renal epithelial cells via induced pluripotent stem cells. *PLoS One.* 2016;11(5):1–14.
  40. Petersen T, Møller-Larsen A, Ellermann-Eriksen S, Thiel S, Christensen T. Effects of interferon-beta therapy on elements in the antiviral immune response towards the human herpesviruses EBV, HSV, and VZV, and to the human endogenous retroviruses HERV-H and HERV-W in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* Elsevier B.V.; 2012;249(1–2):105–8.
  41. Petersen T, Møller-Larsen A, Thiel S, Brudek T, Hansen TK, Christensen T. Effects of interferon-beta therapy on innate and adaptive immune responses to the human endogenous retroviruses HERV-H and HERV-W, cytokine production, and the lectin complement activation pathway in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* Elsevier B.V.; 2009;215(1–2):108–16.
  42. Mameli G, Cossu D, Cocco E, Frau J, Marrosu MG, Niegowska M, et al. Epitopes of HERV-Wenv induce antigen-specific humoral immunity in multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol.* Elsevier B.V.; 2015;280(C):66–8.
  43. Mameli G, Astone V, Arru G, Marconi S, Lovato L, Serra C, et al. Brains and peripheral blood mononuclear cells of multiple sclerosis (MS) patients hyperexpress MS-associated retrovirus/HERV-W endogenous retrovirus, but not human herpesvirus 6. *J Gen Virol.*

- 2007;88(1):264–74.
44. Garcia-Montojo M, Dominguez-Mozo M, Arias-Leal A, Garcia-Martinez Á, de las Heras V, Casanova I, et al. The DNA Copy Number of Human Endogenous Retrovirus-W (MSRV-Type) Is Increased in Multiple Sclerosis Patients and Is Influenced by Gender and Disease Severity. *PLoS One*. 2013;8(1).
45. Garson JA, Tuke PW, Giraud P, Paranhos-Baccala G, Perron H. Detection of virion-associated MSRV-RNA in serum of patients with multiple sclerosis. *Lancet*. 1998;351(9095):33.
46. Kurosawa H. Application of Rho-associated protein kinase (ROCK) inhibitor to human pluripotent stem cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Elsevier Ltd; 2012. p. 577–81.
47. Li X, Krawetz R, Liu S, Meng G, Rancourt DE. ROCK inhibitor improves survival of cryopreserved serum/feede-free single human embryonic stem cells. *Hum Reprod*. 2009;24(3):580–9.
48. Stover AE, Schwartz PH. The generation of embryoid bodies from feeder-based or feeder-free human pluripotent stem cell cultures. *Methods Mol Biol*. 2011;767:391–8.
49. Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, Nishiyama A, Matsumura M, Wataya T, et al. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2007;25(6):681–6.
50. Li X-J, Zhang S-C. In vitro differentiation of neural precursors from human embryonic stem cells. *Methods Mol Biol*. 2006;331(3):169–77.
51. Mak W, Baxter J, Silva J, Newall AE, Otte AP. Mitotically stable association of polycomb group proteins Eed and Enx1 with the inactive X chromosome in trophoblast stem cells. *Curr Biol*. 2002;12(12):1016–20.
52. Oda M, Shiota K, Tanaka S. Trophoblast Stem Cells. *Methods Enzymol*. 2006;419(6):387–400.
53. Hongao M. RNA, DNA and protein isolation using TRIzol reagent. *Nat an Sci*. 2008;6(18068):1–10.
54. Roberts RM, Fisher SJ. Trophoblast Stem Cells. *Biol Reprod*. 2011;84(3):412–21.
55. Zhang S-C, Wernig M, Duncan ID, Brüstle O, Thomson JA. In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2001;19(12):1129–33.
56. Tornero D, Wattananit S, Madsen MG, Koch P, Wood J, Tatarishvili J, et al. Human induced pluripotent stem cell-derived cortical neurons integrate in stroke-injured cortex and improve functional recovery. *Brain*. 2013;136(12):3561–77.
57. Liedtke S, Enczmann J, Waclawczyk S, Wernet P, Kögler G. Oct4 and Its Pseudogenes Confuse Stem Cell Research. *Cell Stem Cell*. 2007. p. 364–6.
58. Zangrossi S, Marabese M, Broggini M, Giordano R, D’Erasmo M, Montelatici E, et al. Oct-4 Expression in Adult Human Differentiated Cells Challenges Its Role as a Pure Stem Cell Marker. *Stem Cells*. 2007;25(7):1675–80.
59. Liedtke S, Stephan M, Kögler G. Oct4 expression revisited: Potential pitfalls for data misinterpretation in stem cell research. *Biological Chemistry*. 2008. p. 845–50.
60. Atlasi Y, Mowla SJ, Ziaeef SAM, Gokhale PJ, Andrews PW. OCT4 Spliced Variants Are Differentially Expressed in Human Pluripotent and Nonpluripotent Cells. *Stem Cells*. 2008;26(12):3068–74.
61. Kim J Do, Kim H, Ekram MB, Yu S, Faulk C, Kim J. Rex1/Zfp42 as an epigenetic regulator for genomic imprinting. *Hum Mol Genet*. 2011;20(7):1353–62.
62. Domogatskaya A, Rodin S, Tryggvason K. Functional Diversity of Laminins. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2012;28(1):523–53.
63. 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.
64. Zhou J, Chu J, Chen X. An improved protocol that induces human embryonic stem cells to differentiate into neural cells in vitro. *Cell Biol Int*. 2008;32(1):80–5.
65. Shimozaki K, Nakashima K, Niwa H, Taga T. Involvement of Oct3/4 in the enhancement of neuronal differentiation of ES cells in neurogenesis-inducing cultures. *Development*. 2003;130(11):2505–12.
66. Oki K, Tatarishvili J, Wood J, Koch P, Wattananit S, Mine Y, et al. Human-induced pluripotent stem cells form functional neurons and improve recovery after grafting in stroke-damaged brain. *Stem Cells*. 2012;30(6):1120–33.
67. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*. 2007;131(5):861–72.
68. Sarkar P, Rice CM, Scolding NJ. Cell Therapy for Multiple Sclerosis. *CNS Drugs*. Springer International Publishing; 2017. p. 453–69.

## A. ANEXOS

---

### A.1. Primers utilizados en los ensayos de expresión

Gen	Primer	Secuencia 5' →3'	Amplicón (bp)
<i>GAPDH</i>	Fw	ATCAGCAATGCCTCCTGCAC	103
	Rv	TGGCATGGACTGTGGTCATG	
<i>REX1 (1)</i>	Fw	GAGCCCGGATCCATGAGCCAGCAACTGAAGAACGG	480
	Rv	CAATGCCAGGTATTCCCTCCAGGCG	
<i>REX1(2)</i>	Fw	ACATGACAGGAAGAAGCTTCCGC	420
	Rv	GAGCCCGGATCCTACTTCCCTTTGTCATTCTT	
<i>OCT4</i>	Fw	CGACCATCTGCCGCTTGAG	573
	Rv	CCCCCTGTCCCCATTCTTA	
<i>PAX6</i>	Fw	AATAACCTGCCTATGCAACCC	207
	Rv	AACTTGAACCTGGAACTGACACAC	
<i>SOX1</i>	Fw	CAATGCGGGGAGGGAGAAGTC	464
	Rv	CTCTGGACCAAACTGTGGCG	
<i>NESTIN</i>	Fw	GGCAGCGTTGGAACAGAGGT	143
	Rv	CATCTTGAGGTGCGCCAGCT	

Tabla A.1.- *Primers* usados en los ensayos de expresión.

### A.2. Primers utilizados en los ensayos de metilación

Primer	Secuencia 5' →3'	Amplicón (bp)
<i>Forward</i>	TTTTTAAGAATGAGGAGATGGA	
<i>Reverse</i>	TCTCAACAAAAAAACCCAAA	399
<i>Reverse- Biotina</i>	TCTCAACAAAAAAACCCAAA- Bio	
<i>Secuenciador</i>	AATGGAGTTTAGATGTAGTTATGATTA	

Tabla A.2.- *Primers* utilizados en los ensayos de metilación.

### A.3. Origen del medio MEFCM

El medio condicionado MEFCM se obtuvo del cultivo de MEFs irradiados en flasks con un 0.1% de gelatina y medio MEF (Tabla A.1), suplementando 10 µg/ml de FGF2. Brevemente, se recogió cada día el sobrenadante del cultivo y se añadió medio fresco con FGF2. Finalmente, el medio condicionado se centrifugó 15 minutos a 500 g, se filtró, alicuotó y congeló a -80°C para su posterior uso.

Componente	Concentración final	Proveedor
KO DMEM		Thermo Fisher
Glutamax	1X	Thermo Fisher
NEEA	1X	Sigma-Aldrich
2-mercaptoetanol	50 µM	Sigma-Aldrich
Knock out serum replacement (KSR)	20%	Thermo Fisher
Penicilina y estreptomicina (P/S)	1X	Sigma-Aldrich

Tabla A.3.- Composición del medio MEF usado en el cultivo de MEFs.