

ABREVIATURAS

CMEH: Células Madres Embrionarias Humanas.

SNC: Sistema Nervioso Central.

SNP: Sistema Nervioso Periférico.

CMPI: Células Madre Pluripotentes Inducidas.

CME: Células Madres Embrionarias.

MAP2: Proteína Asociada a Microtúbulos 2.

MEF: Fibroblastos Embrionarios de Ratón.

ROCK: Proteína quinasa asociada a Rho.

EROs: Especies Reactivas del Oxígeno.

Shh: Sonic hedgehog.

BMP: Proteína Morfogénica Ósea.

AR: Ácido Retinoico.

PMP: Purmorfamina.

PFA: Para-formaldehído.

SBB: Sudan Black B.

ChAT: Colina acetiltransferasa.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1.	RESUMEN	1
2.	INTRODUCCIÓN	2
3.	OBJETIVOS	5
3.1.	Objetivo General	5
3.2.	Objetivos específicos	5
4.	MARCO TEÓRICO	6
4.1.	Sistema nervioso central y células que lo conforman	6
4.2.	Cultivo celular primario de células gliales y neuronas	8
4.2.1	Cultivo celular tipo “Sándwich”.	9
4.2.2	Maduración neuronal en cultivo celular.	11
4.3.	Células madres embrionarias humanas (CMEH).	13
4.3.1.	Desarrollo de neuronas motoras.	15
4.3.2.	Inducción neural en CMEH.	17
4.4.	Cambios en el sistema nervioso central durante el envejecimiento.	19
4.4.1.	Envejecimiento neuronal.	20
4.4.2.	Disfunción mitocondrial durante el envejecimiento neuronal.	22
4.4.3.	Inflammaging: Rol de la inflamación durante el envejecimiento.	23
4.5.	Lipofuscina, un marcador de envejecimiento.	24
4.5.1.	Lipofuscinogénesis.	25
4.5.2.	Detección de lipofuscina.	26
4.5.3.	Lipofuscina en sistema nervioso central.	27
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	29
5.1.	Cultivo de células madres embrionarias humanas (CMEH)	29
5.1.1.	Diferenciación de las CMEH a través de formación de cuerpos embrionarios.	29
5.1.2.	Diferenciación de CMEH a motoneuronas	30
5.1.3.	Plantado de motoneuronas humanas	30
5.1.4.	Cultivo celular tipo Sandwich	31

5.1.5.	Fijación de motoneuronas.	31
5.2.	Preparación de reactivo Sudan Black B (SBB).	32
5.2.1.	Tinción de lipofuscina con Sudan Black B.	32
5.3.	Disección de cerebro de ratón para obtención de astrocitos.	33
5.3.1.	Cultivo celular de células astrocíticas.	34
5.4.	Inmunocitoquímica en motoneuronas para observar estructuras.	34
6.	RESULTADOS	36
6.1.	Pluripotencia en colonias de CMEH (HUES9) antes de iniciar la diferenciación neuronal.	36
6.2.	Motoneuronas derivadas de CMEH (HUES9)	37
6.3.	Tinción de lipofuscina en motoneuronas derivadas de CMEH (HUES9).	38
6.4.	Inmunocitoquímica de motoneuronas derivadas de CMEH (HUES9)	40
6.5.	Células gliales derivadas de corteza cerebral de ratón.	41
7.	DISCUSIÓN	42
8.	CONCLUSIÓN	49
9.	BIBLIOGRAFÍA	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del protocolo de generación neuronal a partir de células madres embrionarias humanas y cultivo celular tipo "sandwich".	10
Figura 2. Estadios de la maduración de las neuronas hipocampales en cultivo <i>in vitro</i> .	12
Figura 3. Protocolo de diferenciación de neuronas motoras a partir de células madres embrionarias humanas.	18
Figura 4. Esquema de tinción de los gránulos de lipofuscina con Sudan Black B (SBB).	33
Figura 5. Protocolo de inmunodetección mediante microscopía confocal de fluorescencia para identificación de estructuras neuronales	35
Figura 6. Marcadores inmunocitoquímicos de pluripotencia en colonias de CMEH (HUES9).	36
Figura 7. Las motoneuronas derivadas de CMEH permanecen viables en cultivo a largo plazo.	38
Figura 8. Identificación de gránulos de lipofuscina con Sudan Black B (SBB) en motoneuronas derivadas de células madres embrionarias humanas HUES9	39
Figura 9. Identificación de motoneuronas derivadas de CMEH mediante inmunofluorescencia contra ChAT	40
Figura 10. Células gliales obtenidas de corteza cerebral de ratón 3 días post-natal (p3).	41
Figura 11. Inmunodetección de GFAP en células gliales obtenidas de corteza cerebral de ratón de 3 días post-natal (P3).	42