

La Dansa de les Cèl·lules

Ismail Hermelo Akhtar

1.- La Biologia del Desenvolupament o La Dansa de les Cèl·lules.

Un punt. Una circumferència quasi perfecte al mig del no res. Una coordenada com a referència en un sistema de tres dimensions. Una esfera, i no una qualsevol... l'esfera Primordial.

Sota una llum suau, la nostra esfera es revela translúcida i observem que esta plena d'una substància molt semblant a un gel. Si seguim escodrinyant pacientment, veurem que aquest "gel" esta ple de components immersos en una activitat frenètica. De sobte, un calfred fa que la esfera es contragui en el seu interior i aparegui un línia que sembla el seu propi radi, que lentament segueix creixent fins a formar el diàmetre de la mateixa. Amb un moviment tan subtil com elegant, l'esfera primordial no només ha determinat les dues parts de les quals esta formada, sinó que s'ha dividit en dos.

Meravellats per veure tan inesperat esdeveniment, trobarem que no es l'únic que veurem, sinó que és el primer, d'una llarga llista de divisions que experimentarà l'esfera primordial que estem observant. En durà a terme tantes, de fet, que perdrem el compte més enllà de la trentena divisió; on l'esfera prèvia quasi perfecte plena de gel, haurà donat pas a una altra plena de petites esferes molt similars a la original, en una sort de fractal o calidoscopi de si mateixa.

Ara que el número d'esferes interiors es va incrementant, molt més enllà de les cent esferes, podrem apreciar l'extrema coordinació de totes les esferes interiors. No hi ha res a l'atzar, almenys en el camp visible. Els moviments són tan suaus com precisos, similars en gracia i bellesa a qualsevol dansa tradicional. Tant elegants, que es pot anomenar la Dansa de les Cèl·lules.

1.1.-L' embriogènesi

Com s'haurà intuït, la nostra esfera primordial és el zigot, la cèl·lula resultant de la unió dels dos **gàmetes**, les cèl·lules que es fusionen els seus nuclis respectius durant la concepció (fertilització) en els organismes de reproducció sexual.

En el cas del gènere humà, el gàmeta femení és l'**òvul** i el gàmeta masculí és l'**espermatozoide**. Es tracta d'unes cèl·lules que contenen la meitat d'informació o contingut genètic (DNA, àcid desoxiribonucleic) que les cèl·lules que conformen els individus de l'espècie (car són **haploides**). Un cop fusionats els nuclis, o més ben dit, donada la grandària de l'òvul respecte l'espermatozou, un cop el gàmeta masculí penetra en el femení, la cèl·lula resultant és el zigot, on ara es suma el contingut genètic dels dos progenitors (és **diploide**), conté la informació necessària per iniciar un dels processos biològics més Impressionants com Misteriosos de la Natura: el desenvolupament a partir d'**una** sola cèl·lula d'un organisme fet de milers de milions de cèl·lules (organisme multicel·lular), constituït no per un sol tipus de cèl·lules, sinó per tot un seguit de llinatges cel·lulars tan diversos com especialitzats per la tasca que han de desenvolupar, en el nou individu que formaran "literalment".

Aquest és el procés que comprén des de la fertilització fins a la formació de l'embrió, l'**embriogènesis**. Un cop assolida la primera etapa del desenvolupament, passa a denominar-se fetus, fins al moment del naixement.

Centrant-nos en la primera etapa del desenvolupament, partint de l'estadi unicel·lular, els processos que hi tenen lloc determinen el futur de l'individu. Com en tota dansa, qualsevol error en un pas, es pot recuperar fàcilment seguint endavant com si res. Però, i si en la dansa hi intervenen centenars d'individus o, milers? La coordinació hauria de ser excepcional, donat que l'error d'un sol pot propagar-se perillosament i comprometre l'execució de tots com a grup. El mateix passa en el zigot, on les divisions que es produiran han de ser perfectes i, com més cèl·lules el formen, més rellevància hi escau.

1.2.-Primeres fases de l'embriogènesi.

Per tal de tenir una idea visual d'aquest procés increïble, explicarem de forma general les fases que duen a la formació de l'embrió, donant cert èmfasis a punts del desenvolupament embrionari que tractarem en la investigació que s'ha realitzat a la facultat.

Conceptes previs:

mitosi: quan una cèl·lula es divideix, produeix dues cèl·lules noves. El contingut genètic de les mateixes, determina quin tipus de divisió ha realitzat la cèl·lula original. Si ha realitzat una mitosis, les cèl·lules filles tenen exactament el **mateix** contingut genètic que la cèl·lula original; això vol dir, que la cèl·lula que s'ha dividit en dos, prèviament ha duplicat el seu contingut genètic o DNA, a fi de poder repartir a parts iguals el DNA en les cèl·lules filles.

El cas contrari, és el de la **meiosi:** en el que la cèl·lula original no duplica el seu contingut genètic, de manera que en dividir-se, les cèl·lules filles tenen la **meitat** de DNA que la cèl·lula de la qual provenen. Aquest tipus de divisió cel·lular, per exemple en humans, es dona en les

cèl·lules precursors dels gàmetes. Entre altres avantatges, aquest tipus de divisió, afavoreix que la informació genètica que conté cada gàmeta, sigui solament una part de la informació completa de la cèl·lula precursora. Això es positiu, perquè afavoreix a la **recombinació** de la informació genètica, és a dir, evita que la informació genètica es repeteixi.

Genèticament parlant, la repetició d'informació comporta certs riscos, com les malalties hereditàries no dominants. La unitat hereditària més elemental del codi genètic és el **gen**, que no és més que un fragment del codi genètic que codifica tots els elements necessaris per la seva expressió regulada. Aquest fragment de codi (o **seqüència de nucleòtids**) té la informació necessària per la síntesis d'una macromolècula, amb una funció cel·lular específica (proteïnes, àcid nucleic missatgers "ARNm", de transferència ARNt...etc.)

Moltes malalties (sobretot, les no dominants o **recessives**), requereixen més d'una còpia per tal de manifestar-se en l'individu, com és en el cas de descendents de progenitors de la mateixa família, endogàmics (informació genètica que tot i recombinar-se, els gàmetes que s'uneixen tenen la un contingut genètic massa proper o similar). Cada progenitor, aporta una de les dos seqüències presents en cada cromosoma, i si cada còpia conté la informació que produeix la malaltia (en cas de ser recessiva), aquesta es manifestarà en l'individu.

La recombinació fa que cada descendent sigui diferent a l'anterior, encara que comparteixin el mateix sexe i progenitors. Com en tota regla, trobem la excepció: Els bessons. Encara que hi ha de dos tipus, els univitel·lins (**monozigòtics**) i els bivitel·lins (**dizigòtics**), els primers són els més famosos, els que probablement van inspirar l'expressió de: "com dues gotes d'aigua".

Els bessons monozigòtics, provenen d'un zigot, la nostra "esfera primordial", que es divideix en "dos" zigots. És diferent tenir, un zigot unicel·lular que es divideix en dos cèl·lules, és a dir, que el zigot està format per **dues cèl·lules**, a tenir **un** zigot unicel·lular que es divideix en **dos zigots** unicel·lulars que seguiran amb les divisions del desenvolupament (el zigot s'ha reproduït **asexualment**).

1.3.- El compàs cel·lular o les fases de l' embriogènesis en humans.

Comença la dansa. La primera etapa del desenvolupament es la **segmentació**, i es comuna per a tots els organismes pluricel·lulars. És el procés que fa passar d'**una** sola cèl·lula, a un embrió fet de **milers** de les mateixes:

Després de la fecundació, es pot nombrar a la cèl·lula **zigot**. La primera divisió mitòtica dona lloc a dos **blastòmers**. A partir de la tercera divisió simultània de blastòmers (12-16 cèl·lules) es dona la **compactació**, determinant una "cavitat" interior que donarà lloc al embrió i un regió exterior o trofoblast que formarà els teixits annexos de l'embrió.

Aquests teixits comencen com membranes. El trofoblast donarà lloc a la part de la placenta corresponent a l'embrió, i la cavitat rodejada o **celoma**, origina dues membranes més, la **Còrion** i la **Amnios**, que alhora rodegen l'embrió en formació.

Un cop el zigot “nia” en l’úter, comença a entrar fluid en els espais existents entre les cèl·lules, conferint al zigot una posició polar. Aquest fluid, s’anirà concentrant en una sola cavitat dins l’esfera que encara es l’embrió, fins a formar una sola cavitat, amb les cèl·lules que formen l’embrió comprimides en un extrem. Aquesta és, la Primera cavitat, una sort de Capella Sixtina, en les que les pintures de Miguel Àngel son les cèl·lules del futur individu. Una vegada l’individu està implantat, es dona la **pregastrulació**, on les cèl·lules de l’embrió s’ordenen en dos nivells o estrats: el **Epiblast** i el **Hipoblast**. Això vol dir, que l’embrió esta format ara per dues capes o tipus de cèl·lules (**embrió bilaminar**).

En l’**Epiblast**, o millor dit, a partir de les cèl·lules que el formen, sorgiran les tres capes embrionàries: **Ectoderm**, **Mesoderm** i **Endoderm**.

El procés que segueix al descrit, es la **gastrulació**. Es tracta de la formació d’una “entrada” o fondalada, anomenada neuroentérica, que uneix les cavitats del sac vitel·lí i la cavitat amniòtica. Les cèl·lules que formen l’epiblast, comencen a dividir-se en massa (**proliferen**) i s’introdueixen en la línia primitiva, com a “grups exploradors de cèl·lules”, que van formant “campaments” en diferents regions de l’embrió, en una coordinació mes pròpia de l’estratègia militar.

Les cèl·lules que “penetren” en l’hipoblast, l’estrat que subjacent, formaran l’**Endoderm embrionari**. Les que es mantenen entre “ambdós plans”, entre l’Epiblast i el Hipoblast, formaran el **Mesoderm embrionari**. Altres formen una espècie de “dorsal” en el mateix epiblast, i seran les progenitores de l’**Ectoderm embrionari**.

Què són aquestes tres “capes” embrionàries?

Primer de tot, es tracta d’estrats cel·lulars o **làmines** (també conegudes com a capes germinatives). Gràcies a la **gastrulació**, es passa d’un embrió format per dues làmines, a un trilaminar. Les cèl·lules que formen cadascuna d’aquestes làmines, són les precursors (o progenitores) de tots els llinatges cel·lulars especialitzats que formen els teixits.

Començant per la capa més interna o **Endoderm**, de forma general, és la precursora del sistema respiratori, fetge, pàncrees i del aparell digestiu (curiosament, sense influir la boca, la faringe i la part final del recte).

En segon lloc tenim el **Mesoderm**. En el mateix, com s’ha explicat, es forma pel desplaçament previ cap al hipoblast les cèl·lules diferenciades del epiblast, que migren per formar un cúmulo de cèl·lules entre les dues làmines, fins a formar una nova, el Mesoderm. Llavors, podem dir que les cèl·lules del mesoderm provenen de cèl·lules que han fet la mitosi de la làmina “de sobre”, o epiblast. La làmina progenitora del Ectoderm. Existeixen varies classes de teixits que es formaran a partir del Mesoderm, que a la seva vegada, originaran distints teixits interns (o mesenquimals). Per ressaltar, el **mesoderm cordat**, donarà lloc a la **notocorda**: òrgan temporal (transitori) que entre d’altres funcions promou la formació del tub neural i l’eix antero-posterior. També destacar, el **mesoderm dorsal somític**: que per la formació d’uns precursors

d'extremitats anomenades **somites**, a banda i banda del tub neural, formarà teixits com el cartílag, el múscul, la dermis o l'esquelet.

L'últim de tots, el **Ectoderm**. Parlant cronològicament, es tracta de la primera làmina germinal de l'embrió. En vertebrats, l'ectoderm es divideix alhora en tres parts: ectoderm extern, les Cèl·lules de la Cresta Neural i el Tub Neural. Donant lloc a estructures tan dispars com la pell i el que hi creix en la mateixa, i el sistema nerviós (perifèric per la cresta neural i central pel tub neural).

És interessant destacar que entre una de les capes que es formaran a partir de l'ectoderm, es troba la corresponent a les cèl·lules que formaran la boca. És com relacionar directament, la capacitat genètic-cerebral de la parla, amb la formació del "aparell" emissor de la mateixa. Una relació que encara que sigui un nexa destacat per l'autor, no deixa de ésser curiós (donat que a nivell d'estructura boca-faringe, les rates podrien parlar; només manquen del anomenat, "gen de la parla").

Així, cadascuna de les tres capes formaran i donaran lloc a les estructures que conferiran òrgans al embrió, en un procés anomenat **organogènesi**. Quins processos cel·lulars, de forma general, es produeixen en cadascuna de les etapes descrites? El creixement i la diferenciació. Es tracta del mateix procés?

Durant el **creixement**, parlem d'activació de gens que fan que hi hagin més cèl·lules (mitosi, generalment). Per el contrari, en la **diferenciació**, la **regulació** de l' **expressió gènica** ostenta el paper principal. La regulació gènica, confereix les propietats diferencials a una cèl·lula per distingir-la entre les altres. Com clarament es veu, la resposta a la pregunta és que No, no és el mateix. El que sí és cert, és el vincle que hi ha entre els dos termes, donat que ambdós formen el desenvolupament biològic.

1.4.- Qui va ser el primer biòleg del desenvolupament?

La resposta és més que sorprenent. Personalment diria que es tracta de tota una lliçó dels Grans Pensadors del passat. Aristòtil! De fet, la resposta a aquesta pregunta es podria especificar encara més, doncs Aristòtil va ser el Primer Biòleg o Fundador de la Biologia i el pare de la Lògica. Encara que existeixen estudis previs documentats, són a partir de la seva figura que es troben estudis sistemàtics en ambdós disciplines.

Parlant sobre la Biologia del desenvolupament, Aristòtil va publicar a l'any 350a.C. un llibre titulat: "La Generació dels Animals" en la que enuncitava el concepte de la **Epigènesi** com procés que explica el desenvolupament d'embrions. Llavors, un organisme està construït de nou i no parteix d'estructures preformades. En altres paraules, que **en** els gàmetes masculí i femení, **no** existeixen versions microscòpiques dels òrgans, teixits que formaran l'individu, sinó que es formen de nou partint del zigot unicel·lular, no diferenciat. Doncs són les senyals externes les que indueixen la formació dels òrgans de l'embrió.

2.-La Biologia del desenvolupament a la Facultat de Biologia.

Una vegada vist com són d'importants les primeres hores del zigot, podem intuir la rellevància que tenen els estudis que es centren en esbrinar quins són els mecanismes que regulen aquest procés. Les repercussions d'aquests estudis són directes sobre el benestar de la població, donat que conèixer els misteris d'aquesta dansa cel·lular comporta saber en profunditat sobre allò que ens forma i, donat el cas d'una malaltia hereditària o adquirida, poder saber amb certesa que es pot fer i que no.

Aprofundir amb una mica més de detall, apart d'un repte estimulants, pot ser la resposta a la pregunta més elemental: com estudien això?

En la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona, en el departament de genètica, existeixen diversos grups d'investigació que centren els seus esforços en aquesta especialitat i entre ells, trobem el Dr. David Bueno.

El Dr. David és docent a la Facultat de Biologia tant a nivell de grau com de màster, investigador en el Departament de Genètica, coordinador (responsable) de les Proves d'Accés a la Universitat (P.A.U.) i les proves d'accés per majors de 25 anys, ambdues pertanyents al Consell Interuniversitari de Catalunya.

Com investigador, és director de tesis doctorals. Es aquí on introduïm a la Doctora Carolina Parada. Prèviament va estudiar Odontologia a la Universitat Nacional de Colòmbia i seguidament encaminà el seu futur cap a la investigació científica, aplicant per a la plaça que va oferir el Dr. David en aquell moment.

No es tracta en cap cas, de mesurar la qualitat d'una tesi doctoral per la quantia d'articles científics, si no més per l'impacte en la Ciència que tinguin els que s'hagin publicat. El paràmetre per mesurar-lo, són les vegades que es cita l'article en sí per altres científics, d'aquí "l'impacte". Com es obvi, només el temps pot respondre amb certesa sobre la repercussió de l'article.

Amb tot, existeix una altra forma (encara que menys fiable que el temps) de preveure la rellevància del mateix, i aquesta és, en "quina" revista es publica, donat que no totes gaudeixen del mateix prestigi acadèmic. Generalment, quant més prestigi, més estricte es l'escrutini al qual es sotmet l'article per tal d'acceptar o rebutjar la seva publicació.

Una vegada dit això, la Dra. Carolina com a estudiant de doctorat va realitzar una tesi brillant. I no només per la qualitat de la investigació (o impacte), sinó a més per la quantitat: cinc articles.

En comptes de parlar-ne superficialment sobre cadascun d'ells, ens centrarem en un, per presentar-lo amb més detall.

3.-El fluid cefaloraquidi.

Tots tenim la imatge del cervell, inclòs dins del crani d'una forma similar a com es troba la nou dins la seva closca. Com a metàfora serveix, però és una imatge llunyana a la real. De fet, una de molt deshidratada. El que fa al sistema cranial una protecció tan efectiva pel cervell són varis factors, entre ells el líquid en el que d'alguna forma, està immers.

Aquest es el líquid cefaloraquidi. Un líquid transparent que embolcalla l'encèfal i la medul·la espinal. El cervell no es una massa de teixit compacta, sinó que posseeix unes cavitats o cambres, anomenades ventricles. Aquestes "cambres secretes" que també estan connectades entre si, estan plenes del fluid cefaloraquidi, doncs es forma en les mateixes. Principalment en una regió que s'anomena els **plexes coroides** (en humans).

Al ser una superfície interna, les cèl·lules que formen el revestiment (l'**epiteli**) de la cambra són especials, doncs estan sobre el teixit connectiu, no nerviós (com en el cas de la medul·la espinal). En termes generals, aquestes cèl·lules fortament unides formen la **tela coroides**, que al replegar-se, forma els **plexes coroides**. Aquests a la vegada, estan plens de capil·lars sanguinis. Filtren el plasma de la sang i l'alliberen a modus de secreció al ventricles ara com a fluid cefaloraquidi (FCR). Des de els ventricles que els formen, discorre cap als següents orificis que els connecten, fins a recórrer la superfície de l'encèfal.

Les funcions generals del FCR, a part d'esmoreir com s'ha introduït, s'eliminar metabòlits del sistema nerviós i en cert grau aportar micronutrients, però de forma suplementària. També, actua com a canal de transmissió de certes hormones, com les de la **glàndula pineal** (el nostre rellotge biològic).

3.1.- Funcions desconegudes del Fluid cefaloraquidi (FCR).

Un fluid encarregat de tantes coses de cara al sistema nerviós i amb la relació íntima que manté amb aquest, implica d'alguna manera, regulació sobre el mateix. Potser això va pensar la Dra. Carolina quan va estudiar els components del mateix, durant les etapes del desenvolupament embrionari.

Durant les primeres fases del desenvolupament, just quan s'acaba de formar el **neuroporus**, es produeix la formació del que serà el futur cervell, parlant estructuralment, juntament amb les seves "cambres secretes". Durant aquest mateix procés, aquestes cavitats són emplenades amb el fluid del **tub neural**, conegut com el fluid cefaloraquidi embrionari (o fluid cerebroespinal embrionari, influït per l'anglès: *embryonic cerebrospinal fluid*; E-CSF).

S'han descrit diverses funcions del FCR-embrionari en relació a la regulació del desenvolupament cerebral, tant a nivell embrionari com fetal. El FCR-embrionari, com s'ha descrit, està en contacte directe amb les "parets" dels futurs ventricles del cervell. Les cèl·lules que revesteixen aquestes parets són les neuroepitelials. Entre les funcions del FCR-embrionari, es troba la de exercir una pressió positiva (es a dir, "empènyer") contra les parets dels

ventricles, de forma que expandeix la cavitat dels mateixos. També promou la supervivència, proliferació i diferenciació de les cèl·lules progenitores de les neuroepiteliais; també controla la formació de capes neuronals en el còrtex i la proliferació a nivell fetal.

Aquestes funcions reguladores, es veuen reforçades per les dades obtingudes a partir del fluid cefaloraquídi (FCR) en el moment de **màxima proliferació** de les cèl·lules progenitores de les neuroepiteliais en embrions i fetus, tant de gallines, rates i humans, incloent les mateixes molècules proteiques descrites durant el desenvolupament d'altres sistemes.

Entre les proteïnes trobades en el FCR de gallines, rates i humans estan les de la família de les **apolipoproteïnes**.

Què són les apolipoproteïnes?

Són les proteïnes que contenen lípids (les molècules que formen el greix) i alhora, els transporten en el torrent sanguini. Aquesta família de proteïnes esta composta per varis tipus: ApoA, ApoB.etc. Les apolipoproteïnes en unir-se formen una macromolècula anomenada **lipoproteïna**. Gracies a la presència de les apolipoproteïnes que formen l'estructura de la lipoproteïna, són reconegudes per receptors específics de determinats tipus cel·lulars. Donada aquesta funció, les apolipoproteïnes tenen un paper important en el metabolisme lipídic (dels greixos).

En adults, les apolipoproteïnes més abundants son les HDL (*high density lipoproteins*: Lipoproteïnes d'alta densitat) i la LDL (*low density lipoproteins*: Lipoproteïnes de baixa densitat).

A banda de transportar lípids, estan implicades en la formació de les **sinapsis** (les connexions més importants entre dues neurones, les que transmeten l'impuls nerviós), la regulació del creixement de **neurites** (qualsevol de les projeccions de membrana que observem en les neurones, aquest aspecte "d'estrella", són neurites, fins que una creix més que les altres, donant-li un aspecte similar a un "cometa"; la cua del cometa deixa d'anomenar-se neurita, ja que ara es l'**axó** de la neurona).

Metabolisme de lípids, implicat en el desenvolupament del sistema nerviós?

Llavors, que succeeix si això falla? En embrions s'ha descrit que defectes en la biosíntesi i transport de colesterol, transport de lípids, o defectes en l'assemblatge de les lipoproteïnes (apolipoproteïnes + lípids) comporta alteracions en la formació i funcionalitat del Sistema Nerviós Central (SNC). De la mateixa manera, deficiències en els **receptors de lipoproteïnes**, els que s'encarreguen d'entrar els lípids i el colesterol dins la cèl·lula, produeixen efectes similars sobre el SNC.

Es pot afirmar, que el SNC durant les primeres etapes del desenvolupament, depèn **críticament** de l'aportació contínua de molècules de colesterol.

3.2.- Les premisses.

Tenim per una banda, l'aportació necessària de molècules lipídiques i de colesterol per a un desenvolupament normal del SNC, llavors, si les proteïnes transportadores (com les apolipoproteïnes) no són funcionals, s'associen a defectes en el desenvolupament.

En un estudi, es va demostrar amb ratolins deficitaris de la apolipoproteïna ApoB (obtinguts per enginyeria genètica, *knockouts*) morien durant les primeres fases del desenvolupament, mostrant un creixement dispar en teixits derivats del neuroepiteli. És important destacar que la ApoB es la proteïna majoritària de les **LDL** (*Low density lipoprotein*: proteïna de baixa densitat) i de la **VLDL** (*Very Low Density Lipoprotein*: proteïna de molt baixa densitat), ambdues responsables del transport lipídic del plasma als teixits.

Paral·lelament, estan els receptors cel·lulars, com s'ha comentat. Aquests s'expressen també en l'embrió mentre es forma, car tenen un paper important en el transport lipídic de l'embrió. La majoria dels receptors identificats formen part de la família dels gens dels receptors **LDL**, que tenen com a lligands (les molècules que en aquest cas, s'uneixen als receptors) les apolipoproteïnes apoB i apoE, amb els seus papers rellevants en l'entrada intracel·lular dels lípids.

Llavors, basant-se en aquestes potents premisses, l'argument de que les lipoproteïnes tenen un paper fonamental en la regulació del sistema nerviós durant les primeres etapes del desenvolupament, es més que sòlid.

Així, la Dra. Carolina va analitzar el contingut lipídic i lipoproteic del fluid cefaloraquídi embrionari (FCR-E) en galls i ratolins (tant en exemplars sans, com en deficitaris en el **receptor LDL**, es a dir, **LDLR**: *Low density lipoprotein receptor*). També va analitzar el paper d'aquestes lipoproteïnes en etapes primàries de la neurogènesi.

4.-Resultats.

4.1.-Composició del fluid cerebrospinal de pollastres.

Utilitzant tècniques d'anàlisi de contingut de proteïnes (proteomas), estudis previs realitzats per la Dra. Carolina, analitzaren els proteomas tant d'aus com de mamífers. La diferència més important va ser el contingut proteic pertanyent a la família de les apolipoproteïnes, era més gran en rates. Tenien els grups presents en els pollastres, més tres, és a dir, en total **cinc** tipus d'apolipoproteïnes diferents.

TAULA 1) Estudi en pollastres de la composició de Lípids i Lipoproteïnes en el plasma d'un individu adult*(*Adult Plasma*), plasma embrionari**(*E-Plasma*) i fluid cefaloraquidi embrionari (*E-CSF*)***.

TABLE I. Lipid and lipoprotein composition in E-plasma, E-CSF and adult plasma of chicken

	Cholesterol (mM)	Triglycerides (mM)	Protein (g/L)
Adult plasma			
VLDL	0.46	0.23	0.51
LDL	3.70	0.12	2.09
HDL	3.85	0.14	7.28
Lipoprotein-depleted fraction	0.01	0	20.8
E-Plasma			
VLDL	1.49	7.51	1.52
LDL	0.38	1.08	0.71
HDL	0.08	0.28	0.18
Lipoprotein-depleted fraction	0.08	0.15	3.32
E-CSF			
VLDL	0.40	0.21	0.05
LDL	0.36	0.08	0.04
HDL	0.14	0.05	0.02
Lipoprotein-depleted fraction	0.05	0.08	0.46

On **VLDL**: *Very Low Density Lipoprotein*; Lipoproteïna de molt baixa densitat.

LDL: *Low Density Lipoprotein*; Lipoproteïna de baixa densitat.

HDL: *High Density Lipoprotein*; Lipoproteïna d'alta densitat.

Lipoprotein-depleted fraction (LDF): Fracció restant a l'eliminar la lipoproteïna.

Com s'ha introduït, les apolipoproteïnes tenen un rol bàsic en el transport de lípids i el FCR-embrionari té un paper determinant durant la neurogènesi; per això, com a primer pas, per veure les funcions d'aquestes proteïnes durant la neurogènesi es va analitzar el contingut lipídic i proteic del pollastre en els estadis indicats *, **, ***.

Utilitzant mètodes d'ultracentrifugació (separació de components en base a la diferent densitat) es van aïllar per una part, les lipoproteïnes i per altra, la fracció lipídica (colesterol i triglicèrids) que "transportaven". També la concentració total de proteïnes.

Es va analitzar el plasma de pollastres adults per confirmar la validesa de la metodologia emprada, i així fou. Les quantitats obtingudes són les descrites en la bibliografia científica prèvia, per un pollastre sa. Com s'observa en la **taula 1**), la lipoproteïna més abundant en el adult és l'**HDL** (7.28mM, "mM = milimolar") junt amb la majoria del colesterol unit al **LDL** (3.85mM).

Si observem el contingut de triglicèrids en el plasma embrionari (9.02mM, valor obtingut sumant la concentració de triglicèrids de totes les fraccions: VLDL+LDL+HDL+LDF), veurem que

són molt més abundants que en comparació al plasma de l'adult (0.49mM, valor obtingut realitzant la mateixa operació).

Altra diferència a remarcar, és el contingut total de colesterol en el plasma de l'embrió de pollastre (a 24 hores de desenvolupament="HH24", 2.03mM) que és clarament menor al contingut plasmàtic de l'adult (8.02mM).

Gràcies al fet de separar cada classe de molècula i la seva carga (en aquest cas triglicèrids o colesterol) es van poder acotar les diferències entre el plasma embrionari i el del pollastre adult. Això significa que el patró lipoproteic, encara que globalment es quantifiquin les diferències, afinar y veure **quines** molècules són les que produeixen aquesta diferència de valors. Observant la **taula 1**) veiem que el plasma embrionari té major proporció de **VLDL** i **LDL** (10.46mM; sumant ambdues VLDL+LDL pels seus valors de colesterol y triglicèrids) en comparació al plasma de l'adult(4.51mM). En aquesta diferència, veiem clarament qui potencia la mateixa: el contingut en triglicèrids portats per la **VLDL** (7.51mM).

En el plasma embrionari **taula 1**), com s'esperava, s'observen unes quantitats molt baixes de colesterol referit al **HDL** (0.08mM) en comparació al plasma d'adult (3.85mM). A més, també s'esperava observar una menor concentració en la **LDF** pertanyent al colesterol + triglicèrids (0.23mM); ja que la fracció més gran en la **LDF** fou la proteica (3.32mM).

Fixant-nos ara en la composició plasmàtica global de colesterol y triglicèrids del FCR-Embrionari a 24 de gestació "HH24" (1.37mM) era menor en comparació al contingut global de plasma pertanyent de l'adult (8.51mM). En quant al contingut en colesterol i proteïnes els valors foren molt semblants; per exemple, pel colesterol els valors de **VLDL** eren (0.40mM) i per **LDL** eren (0.36 mM). Es pot remarcar que la majoria dels triglicèrids s'obtingueren del **VLDL** (0.21mM, de los 0.42mM totals, això es, la meitat units **només** al **VLDL**).

Si comparem el contingut lipídic (colesterol + triglicèrids) per **HDL** (0.19mM) en el FCR-E amb el contingut lipídica unit al **HDL** en el plasma d' adult (3.99mM), observem clarament que és menor. El mateix ocorre amb els valors de proteïna per **HDL**, (0.02mM en plasma FCR-E), mentre que en el plasma d'adult (7.28mM).

Això és, **poca** presència de **HDL** en el plasma del FCR-E.

Per confirmar aquests resultats que mostren un patró lipoproteic clar, se prosseguí amb altra tècnica experimental anomenada electroforesis.

4.2.- Electroforesi dels fluids obtinguts en cada estadi.

El gel electroforètic, es basa en un principi molt senzill. L'estructura molecular de les proteïnes, tenen àtoms (o grups d'ells) amb càrrega elèctrica (és a dir, en un sistema +/-, o polaritat positiva/negativa, com els pols d'un imant). Si en un extrem de l'estructura hi ha un àtom "carregat" positivament, i en la proximitat (a nivell atòmic) hi ha un altre carregat negativament, les "càrregues" es compensen, així la càrrega global de la proteïna és zero. A això, se li diu el **Punt Isoelèctric (P.I.)**. Quan una proteïna té diferents càrregues, que no es

compensen entre si, (per exemple: dos negatives i una positiva) diem que la càrrega global de la proteïna és **negativa**.

El gel d'electroforesi, que no és més que una matriu de polímer de càrrega "neutra" que s'assembla a una "xarxa" molecular, es submergeix en aigua i se li fa passar un corrent elèctric (força electromotriu), de manera que les proteïnes en funció del seu "càrrega global", migren més o menys en direcció a l'ànode (pol negatiu). Així, l'electroforesi juga amb aquest principi (P.I.), juntament amb la **mida** i la **forma** (estructura terciària) de les proteïnes.

Un altre factor que es pot "modular" en pro de les característiques de la proteïna a aïllar (per exemple, si és molt petita), és la mida dels porus del gel; simplement, variant la seva densitat.

Què passa si les proteïnes buscades es troben al (P.I.)?

La unitat bàsica d'una proteïna són els aminoàcids. Si ens imaginem la proteïna com una **cadena** d'aminoàcids, la seva estructura tridimensional es forma a partir d'enllaços entre àtoms presents en aminoàcids llunyans pel que fa a seqüència, que poden establir aquesta unió gràcies al fet que la "cadena" es replega sobre si mateixa. És per això que es forma l'estructura tridimensional (terciària) proteica, que "apropa" grups de signe oposat conferint-li càrrega global neutra. Car la força electromotriu no els afecta (no migren).

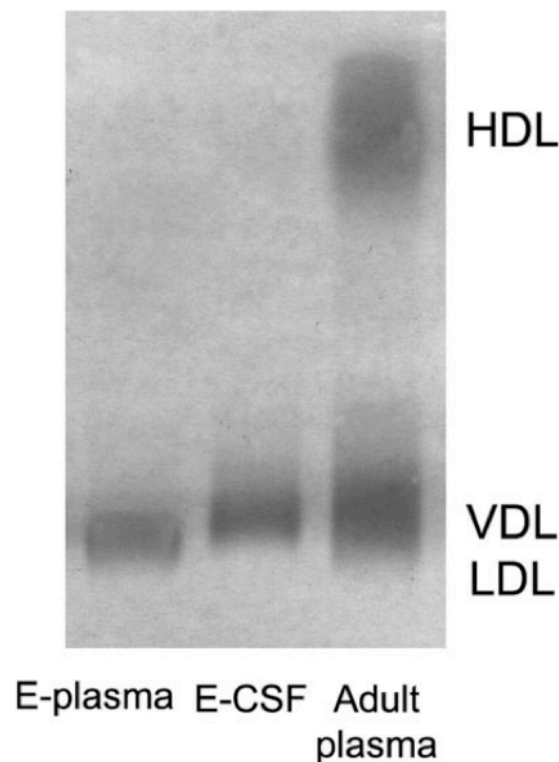
Llavors mitjançant l'afegit d'agents reductors, s'aconsegueix desnaturalitzar a les proteïnes. Es produeix la "ruptura" d'enllaços formats entre àtoms llunyans. La **cadena** d'aminoàcids, es "desplega". El que es coneix com conformació **nativa**.

Resumint, l'agent reductor "talla" els enllaços desplegant l'estructura i el detergent carrega la proteïna negativament (com més gran sigui, més càrrega negativa global). Així, la proteïna es desplaçarà en relació directa a la seva **grandària**, però en direcció al pol positiu (càtode). Com més gran és la proteïna, més lentament es desplaça.

Les proteïnes amb les mateixes propietats, migraran aproximadament la mateixa distància. Acumulant-se en la mateixa secció del gel. És a dir, un embull de proteïnes acumulades una prop de l'altra, formant un tipus de xarxa. Si tenyim les proteïnes, fàcilment observarem la seva posició en el gel. A aquestes "taques" (cúmulo de proteïnes) es coneixen com a "bandes" de proteïna.

A la **Figura 1**), els fluids obtinguts en cada un dels estadis: plasma embrionari (E-plasma), plasma de Fluid cefaloraquídi-Embrionari (E-CSF, en la figura) i plasma adult (Adult plasma) van ser inserits en un gel electroforètic per a la separació dels diferents lipoproteïnes presents en el plasma.

Figura 1) Gel electroforètic de les lipoproteïnes obtingudes del Plasma de pollastres en els estadis (adult: Adult plasma; embrionari: E-plasma; Fluid cefaloraquidi embrionari: E-CSF).



On, **HDL** (*High density Lipoprotein*: Lipoproteïna d'alta densitat)

VDL (*Very Low Density Lipoprotein*: Lipoproteïnes de molt baixa densitat)

LDL (*Low density lipoprotein*: Lipoproteïnes de baixa densitat)

La base del rectangle de la imatge, és cap a on migren les proteïnes. Amb tot el que s'ha explicat, podem intuir que les que han "arribat" fins al "final", són les més petites i lleugeres. En aquest gel, són la **VDL** i la **LDL**.

Quina lectura podem obtenir del gel?

Que confirmem els resultats observats a la **Taula 1**) per l'E-CSF (FCR-E, en català). Com s'observa també en la **Figura 1**), els lípids en el fluid cefaloraquidi són transportats principalment per la **VLDL** i la **LDL**. D'altra banda, comparant amb el plasma de l'adult, pràcticament no s'observa "banda" corresponent a la **HDL**, mentre que en el plasma de l'adult s'observa nítidament.

Com l'efecte de l'FCR-E sobre les cèl·lules neuroepiteliales varia durant el temps, es va procedir a analitzar si el contingut lipídic i lipoproteic varia durant el desenvolupament.

TAULA 2) Composició lipídica de l'E-CSF (FCR-E) durant el desenvolupament.

TABLE II. Lipid composition of E-CSF during development

E-CSF	Cholesterol (mM)	Triglycerides (mM)	Phospholipids (mM)
HH20	1.5	0.55	0.65
HH24	1.35	0.8	0.7
HH27	2.1	0.95	1.05
HH29	2.05	0.95	0.95

FCR-E obtingut a diferents estadis de desenvolupament: **HH20**, **HH24**, **HH27** i **HH29**. Es va analitzar per a cada un d'ells, el contingut en Colesterol, Triglicèrids i Fosfolípids.

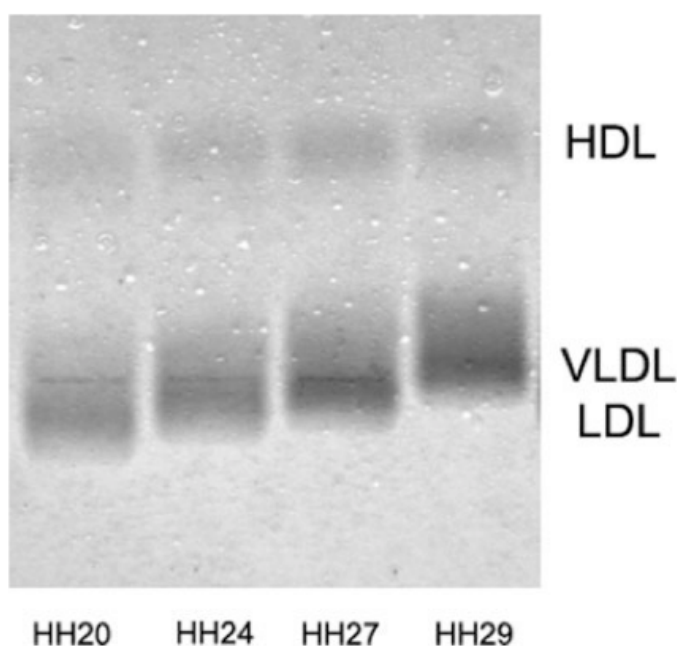
A destacar, observem en la **Taula 2)** com l'augment de les tres variables entre els estadis **HH20** i **HH27**, coincidint amb el període de màxima diferenciació de les cèl·lules progenitores neuroepiteliales.

Un cop assolit el nivell milimolar (mM) a **HH27**, tant per al colesterol, triglicèrids i fosfolípids, els valors no varien de manera substancial.

Com a exemple, per als triglicèrids, a la **Taula 2)** a l'estadi **HH27** és 0.95mM i per l'estadi **HH29** és 0.95mM, igual.

Seguidament, també es va tornar a realitzar un altre gel d'electroforesi per observar el patró lipoproteic dels mateixos estadis que a la **Taula 2)**.

Figura 2) Gel d'electroforesi del contingut del FCR-Embrionari en els estadis de desenvolupament HH20, HH24, HH27 i HH29 (els mateixos que a la Taula 2)).



On, **HDL** (*High density Lipoprotein*: Lipoproteïna d'alta densitat)

VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*: Lipoproteïnes de molt baixa densitat)

LDL (*Low density lipoprotein*: Lipoproteïnes de baixa densitat)

Amb una tècnica diferent, sempre hi ha més probabilitat d'explorar **altres** factors que amb un sol anàlisi no reflecteix. Com és en el cas del patró de "bandes" observat a la **Figura 2**), on veiem que des de l'estadi **HH20** al **HH29** la banda corresponent a **VLDL** i **LDL** varia de manera substancial. Veiem com les bandes, augmenten la seva intensitat. A part, l'autora observà que la bandes, migraven més "ràpid".

Diametralment oposat, el cas de la **HDL**, que no varia en els diferents estadis.

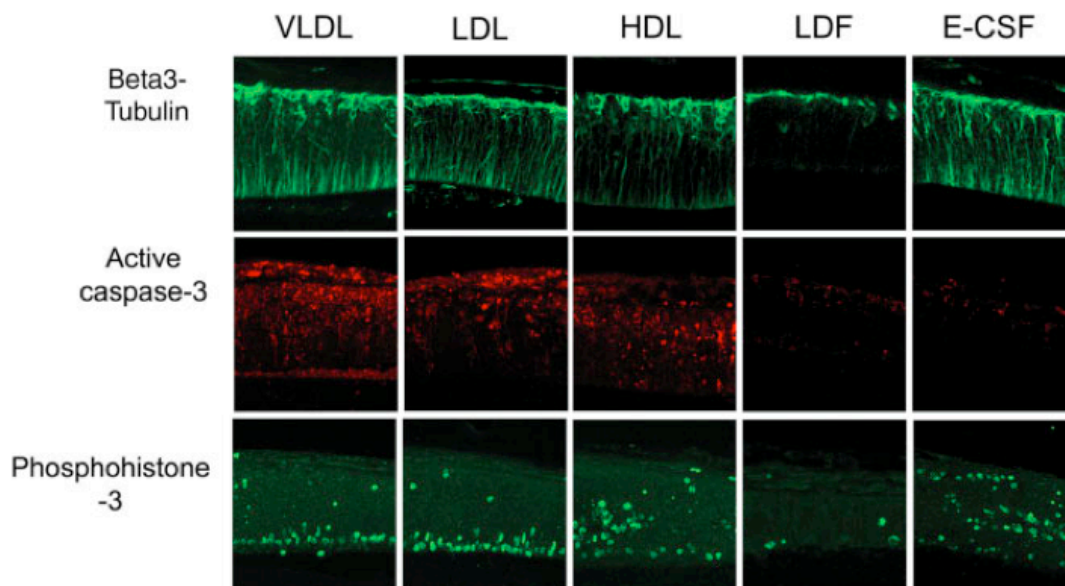
Com les etapes de desenvolupament embrionari estudiades inclouen les de màxima activitat de les cèl·lules progenitores del neuroepiteli i la de l'inici de la diferenciació neuronal, aquests resultats que mostren com el contingut del FCR-E es modula i varia a llarg d'aquest, suggereixen una implicació funcional dels lípids continguts en el fluid cefaloraquídi durant la neurogènesi.

4.3.- Paper de les fraccions lipoproteïques del FCR-E en pollastres sobre la diferenciació de les cèl·lules progenitores del neuroepiteli.

Per estudiar la contribució dels lípids i les lipoproteïnes immerses en el FCR-E a la neurogènesi, es va procedir al cultiu organotípic d'explants del neuroepiteli mesencefàlic. Això és, a diferència del concepte intuïtiu de cultiu cel·lular, en el qual les cèl·lules es cultiven "disgregades", en el cultiu organotípic es col·loca in vitro a una porció (o **explant**) mateix del teixit o òrgan a estudiar. Això permet mantenir les relacions "estructurals" entre les diferents capes de cèl·lules que el formen, de manera que l'**explant** permet estudiar la composició i les relacions "**en**" el teixit; doncs reacciona als estímuls de la manera més similar al que faria en l'organisme.

A nivell de laboratori, se sap que per mantenir la supervivència i induir la proliferació i diferenciació neuronal a nivell de cultiu cel·lular, el FCR-Embrionari és **suficient**. Així el cultiu amb medi químicament definit juntament amb el contingut total del FCR-E, es va usar com el control positiu. Es va aconseguir la inducció màxima de la neurogènesi. Com a control negatiu, es van cultivar els explants només amb el medi químicament definit.

Figura 3A) Anàlisi de la neurogènesi, supervivència neuronal i proliferació en explants neuroepitelials mesencefàlics de pollastre. Imatges representatives del neuroepiteli de pollastre immunomarcades cultivades en diferents condicions.



On, les sigles en la part superior indiquen els mitjans de cultius amb presència de:

VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*: lipoproteïna de molt baixa densitat)

LDL (*Low density lipoprotein*: lipoproteïna de baixa densitat)

HDL (*High density Lipoprotein*: lipoproteïna d'alta densitat)

Lipoprotein-depleted fraction (LDF): Fracció restant en eliminar la lipoproteïna.

Beta3-tubulin (Beta3-tubulina): Es marca la Beta3-tubulina, com a marcador d'inducció neuronal (àmpliament utilitzat com a marcador de neurones).

Active Caspase 3 (Caspasa Activa 3): Indicador de "mort" cel·lular; analitzant la supervivència.

Phosphohistone-3 (Fosfohistona-3): Indicador de proliferació.

Com es pot observar a la **Figura 3 A**), la inducció a neurones va ser analitzada marcant amb fluorescència la Beta3-tubulina. Els mitjans suplementats amb **VLDL**, **LDL** o **HDL** van mostrar nivells d'inducció pràcticament iguals al control positiu (FCR-E). En aquesta fila, cal destacar la reducció d'inducció neuronal en la presència de mig suplementat amb **LDF**, en comparació al control positiu.

Prèviament, s'ha introduït que el FCR-E està implicat tant en la supervivència com en la diferenciació neuronal; per això es va analitzar si aquests paràmetres cel·lulars (supervivència i diferenciació) són independents en els explants cultivats. L'anàlisi de la supervivència per mitjà de la Caspasa Activa-3 va mostrar que els explants suplementats amb **VLDL**, **LDL** o **HDL** tenien més apoptosi (mort) que el control positiu (a més fluorescència vermella, més mort).

D'altra banda, els explants cultivats amb **LDF**, van mostrar poques cèl·lules amb Caspasa Activa-3, com en el control positiu, en altres paraules, morien menys cèl·lules (més supervivència).

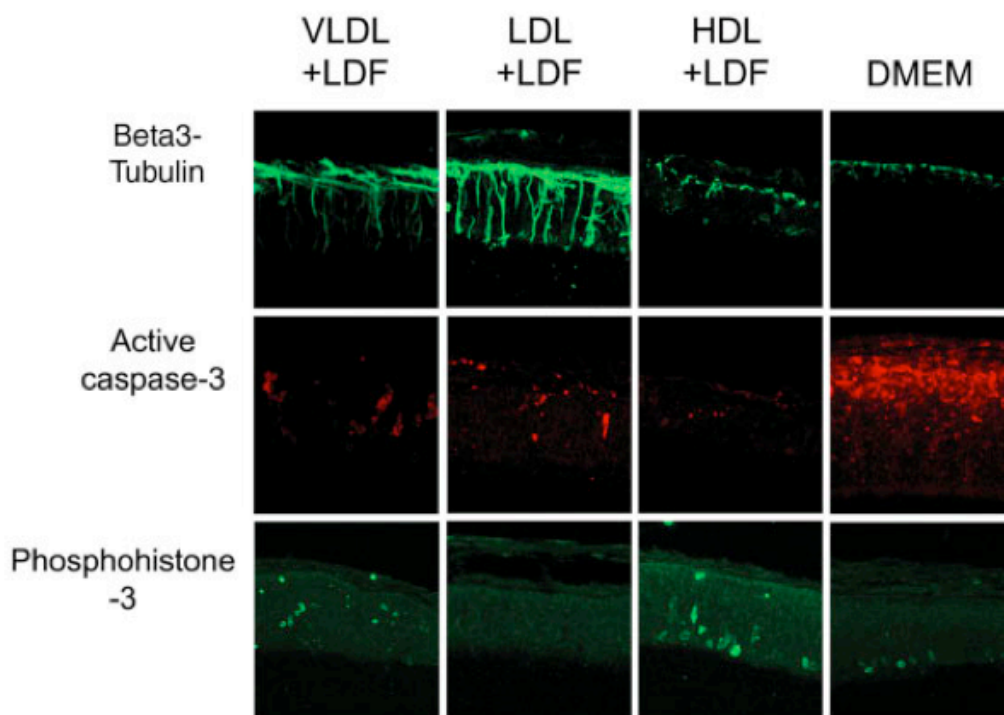
Pel que fa a la proliferació neuronal, els explants cultivats sigui amb **VLDL**, **LDL**, **HDL** o **LDF** mostrar poques cèl·lules fosfohistona-3 positives (és a dir, que s'han marcat amb fluorescència) en comparació al control positiu.

Aquests resultats **suggerixen**, que alguns factors presents en la **LDF** estan implicats estretament en la supervivència cel·lular; sense tenir les mateixes, en l'absència de lípids, un paper en la diferenciació ni en la proliferació.

Per analitzar la validesa d'aquest argument, que components o factors que es troben en la fracció restant en eliminar la lipoproteïna (**LDF**) promouen la supervivència cel·lular en "absència" de lípids, es va prosseguir a combinar els efectes del mateix amb les diferents fraccions lipoproteïques (**VLDL**, **LDL**, **HDL**). Eren capaços d'induir la diferenciació neuronal juntament amb la presència dels factors presents en el LDF?

Així es van cultivar els explants, en medis amb les fraccions lipoproteïques **més** el LDF.

Figura 3B) Anàlisi de la neurogènesi, supervivència neuronal i proliferació en explants neuroepitelials mesencefàlics de pollastre. Imatges representatives del neuroepiteli de pollastre immunomarcades, cultivades en diferents condicions.



On, les sigles en la part superior indiquen els mitjans de cultius amb presència de:

VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*: lipoproteïna de molt baixa densitat)

LDL (*Low density lipoprotein*: lipoproteïna de baixa densitat)

HDL (High density Lipoprotein: lipoproteïna d'alta densitat)

Lipoprotein-depleted fraction (LDF): Fracció restant en eliminar la lipoproteïna.

Beta3-tubulin (Beta3-tubulina): Es marca la Beta3-tubulina, com a marcador d'inducció neuronal (àmpliament utilitzat com a marcador de neurones).

Active Caspase 3 (Caspasa Activa 3): Indicador de "mort" cel·lular; analitzant la supervivència.

Phosphohistone-3 (Fosfohistona-3): Indicador de proliferació.

Es pot ressaltar de la **Figura 3 B**), la diferenciació neuronal induïda per la presència de la fracció lipoproteica de **LDL + LDF**, que és pràcticament el 60% (percentatge facilitat per l'autora) de la inducció aconseguida amb el control positiu (medi suplementat juntament amb la composició completa del fluid cefaloraquídi embrionari (FCR-E)).

És il·lustratiu observar la diferència entre l'explant cultivat amb **LDL Figura 3 A**) i l'explant cultivat amb **LDL + LDF**.

El que es pot dir observant aquests resultats, és que la Lipoproteïnes de baixa densitat (**LDL**) són la fracció lipoproteica majoritària que contribueix a la neurogènesi.

D'altra banda, a nivell de **supervivència**, observem que l'activitat caspasa-3 ara és molt baixa, com s'observa en el control positiu, i en els explants cultivats **només** amb **LDF** (aquest últim, a la **Figura 3A**)).

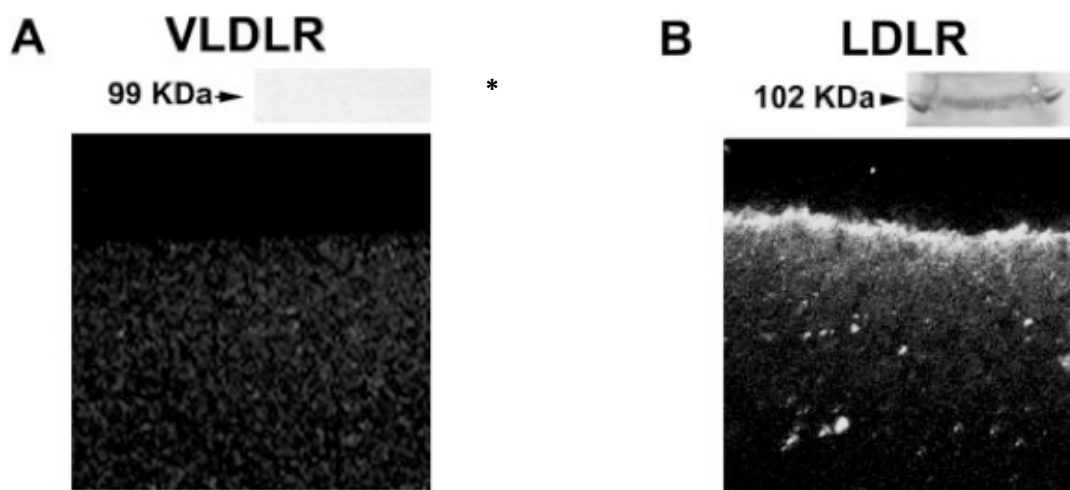
Pel que fa a proliferació, observem una reducció en el nombre de cèl·lules fosfohistona-3 positives, en comparació a les cultivades amb el (FCR-E) complet.

4.3.- Presencia del receptor de LDL y VLDL en el Neuroepiteli mesencefàlic.

Com hem vist, la suplementació en el medi de cultiu del explant amb **LDL + LDF** indueix la diferenciació neuronal en un gran nombre de cèl·lules. Encara que a nivell de quantitat de proteïna, corresponent a cada tipus de apolipoproteïna (**VLDL**, **LDL** o **HDL**), en l'embrió de pollastre la **VLDL** és la fracció més concentrada (0.05g / L), mentre que la **LDL** (0.04g / L), dades de la **Taula 1**).

Com ambdues són lipoproteïnes transportadores de lípids, es va buscar analitzar el **receptor** de les mateixes, localitzats al neuroepiteli mesencefàlic de pollastre.

Figura 4.- Anàlisi per Western Blot de la presència del Receptor del VLDL (VLDLR) Requadre superior * (el mateix per al receptor de LDL) i marcatge per fluorescència del VLDLR en un explant (el mateix per al receptor de LDL).



Com s'observa a la Figura 4.-A) *, no s'observa banda de proteïna pertanyent al receptor **VLDL**. S'assenyala amb una fletxa la regió (o secció del gel) en la qual generalment "arriben" les proteïnes amb un pes molecular de 99KDa.

Gràcies al fet que moltes proteïnes estan caracteritzades, entre altres coses, pel seu pes molecular, és molt fàcil observar la regió del gel en la qual "suposadament" hauria de ser visible la banda, en ser tenyida.

A més a més, es van marcar explants de neuroepiteli mesencefàlic amb immunofluorescència i tampoc es va obtenir senyal del receptor.

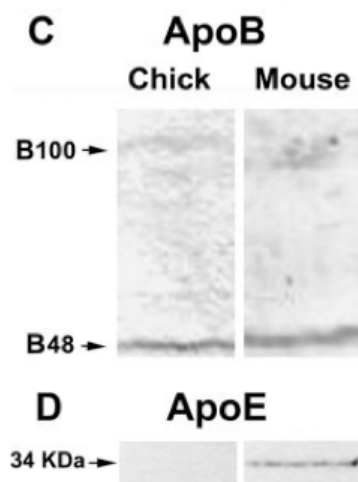
A la **Figura 4 B)**, passa exactament el contrari. Si que apareix la banda proteica corresponent al receptor de **LDL** i al marcar amb fluorescència, s'observa el neuroepiteli ple de **receptors de LDL**.

Com es coneix en estudis previs, entre d'altres lipoproteïnes que formen les **VLDL** i les **LDL**, esta la **apoproteïna B (apoB)**.

Se sap que la apoB és una lipoproteïna crucial en el lliurament de lípids per via receptor cel·lular. Un estudi previ de la Dra. Carolina, va descriure per primera vegada que la proteïna **apoB** esta present entre el fluid cefaloraquidi embrionari, a partir amb una anàlisi proteòmic adequat.

Si es realitzés el western blot, sense saber prèviament que la apoB es present al FCR-E, la banda a la regió "esperada" podria ser qualsevol altra proteïna que tingués el mateix pes molecular.

Figura 4.C) Western Blot per detectar la presència de la apoproteïna B al FCR-E en estadi HH24 en pollastres (esquerra) i en estadi E12.5 en ratolí (dreta). Figura 4.D) Western Blot per detectar la presència de la apoproteïna E al FCR-E a l'estadi HH24 en pollastres (esquerra) i en estadi E12.5 en ratolí (dreta).



Com podem observar a la **Figura 4.C)**, en el requadre de l'esquerra, la banda pertanyent a la apoproteïna B apareix, i els seus dos isoformes també (formes en les que es troba).

Pel que fa a la **Figura 4.D)** requadre de l'esquerra, veiem que **no** apareix la banda corresponent a la **apo E**. Lògic, tenint en conte que en el genoma del pollastre no es troba el gen per a aquesta proteïna.

En canvi pel ratolí, apareixen tant la banda de la apoproteïna B com la de la apoE, codificades ambdues en el genoma dels ratolins.

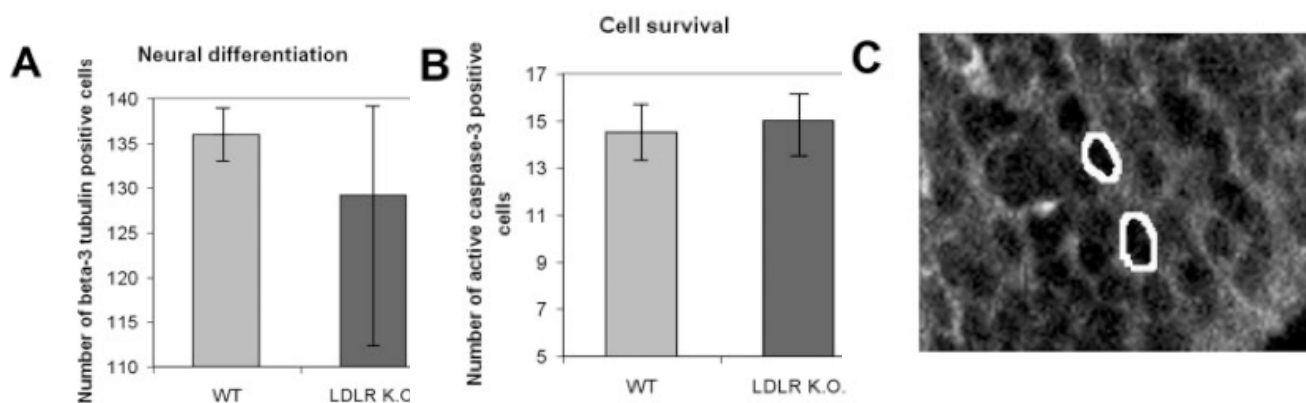
Com veiem, tenim una implicació clara de la **LDL** en la **neurogènesi**, i sent estudiat principalment en pollastres.

Per corroborar els resultats en mamífers, es va procedir a analitzar la diferenciació neuronal al neuroepiteli del mesencèfal i telencèfal de ratolins.

Es van analitzar dues classes de ratolins: uns normals (sans, o en anglès: "*Wild type*": Varietat Salvatge) i els ratolins manipulats (modificats) genèticament, que no tenen el receptor del LDL (**LDLR**), a (anglès: "*LDL KO mice* "; ratolins que no tenen el gen que codifica per al **receptor del LDL**).

Val a dir, que aquests ratolins mutats, tot i **no** tenir el **receptor de LDL**, es van desenvolupar amb aparent normalitat.

Figura 5.- Estudi de diferenciació (A), supervivència neuronal (B) i imatge (C) mostrant el criteri d'identificació de les cèl·lules Beta3-tubulina positives.



On, **WT**: *Wild type*: Ratolins varietat Salvatge (Normal).

LDLR K.O.: *LDL receptor Knock Out*: Ratolins deficients en el receptor LDL.

Com podem observar a la **Figura 5 A**), el gràfic que mostra els valors mitjans de cèl·lules Beta3-tubulina (marcador de diferenciació cap a neurona) en la qual es troba una diferència no significativa entre els dos grups de dades. La línia a la part superior de cada columna, indica la **desviació estàndard**, és a dir, la variabilitat dels valors introduïts o **rang de valors**.

Per poder afirmar que hi ha diferències entre dos o més grups de valors, aquestes línies no han de solapar-se. En el cas de la **Figura 5 A**), veiem que la desviació estàndard és tan àmplia que es solapa amb la de la columna a l'esquerra, car la diferència observada **no és conclouent**.

El mateix passa en l'anàlisi de cèl·lules Caspasa-3 positives (supervivència) **Figura 5 B**), les diferències observades entre els ratolins normals i els deficients en **receptor LDL** no són significatives.

La **Figura 5 C**), ens mostra el criteri per comptar les cèl·lules beta3-tubulina positives; les cèl·lules subratllades amb blanc són les negatives (no brillen).

Aquests resultats obtinguts en els ratolins per al **LDLR KO** recolzen els obtinguts en pollastres, referents a la inducció neuronal, que indicaven que el **LDL** aquesta implicat en la diferenciació neuronal, però no en la supervivència cel·lular.

El observat en mamífers **suggereixen** una funció similar (en diferenciació, veiem que en els deficients per **LDLR** tenen menys diferenciació "que s'esperava" però **no** significatiu), encara que la complexitat inherent del sistema lípid / lipoproteïna en mamífers fan dels resultats no concloents.

Amb aquesta informació respectiva a les cèl·lules progenitores del neuroepiteli deficients en **LDLR**, es va prosseguir amb en anàlisi lipídica i lipoproteica d'aquestes dues varietats de ratolí (la normal i la mutada per al **LDLR**).

TAULA 3) Estudi dos tipus de ratolins, *Wild-type mice* (ratolí sa, normal) i *LDL receptor-deficient mice* (ratolí deficienciari en receptor LDL), de la composició de Lípids i Lipoproteïnes en el plasma d'un individu adult (*Adult Plasma*), plasma embrionari (*E-plasma*) i el fluid cefaloraquídi embrionari (E-CSF).

TABLE III. Lipids in E-plasma, E-CSF and adult plasma of wild-type and LDL receptor-deficient mice

	Cholesterol (mM)	Triglycerides (mM)	Phospholipids (mM)
Adult plasma			
Wild-type mice	1.66	0.47	2.27
LDL receptor-deficient mice	5.43	0.78	4.12
E-Plasma			
Wild-type mice	0.24	0.15	0.15
LDL receptor-deficient mice	0.40	0.15	0.35
E-CSF			
Wild-type mice	0.10	0.30	0.20
LDL receptor-deficient mice	0.75	0.15	0.51

Com s'ha publicat ja en la literatura científica, els ratolins deficienciaris en el **receptor LDL** presenten un augment del colesterol i fosfolípids en plasma, i un lleu increment de triglicèrids en comparació als ratolins normals.

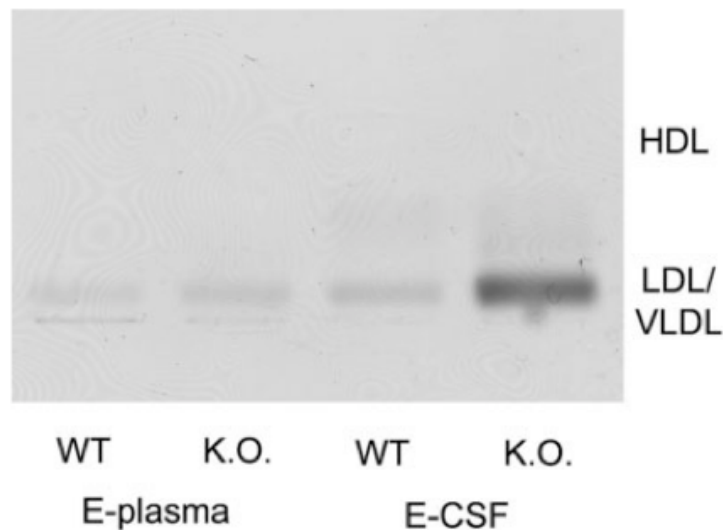
Com es pot observar, tant en el FCR-E (**E-CSF** a la **Taula 3**) el plasma embrionari dels ratolins normals (*Wild-type mice*) presenten uns valors inferiors per als tres paràmetres en comparació a l'adult.

El mateix passa amb els ratolins **mutants LDLR**, on els valors obtinguts del plasma embrionari i el FCR-E són menors a l'adult mutat.

Cal destacar que el contingut de colesterol i fosfolípids embrionaris és superior que en els embrions dels ratolins normals. Per exemple, el colesterol al **FCR-E** dels ratolins **LDLR KO** (0.40mM) és clarament major a l'equivalent sa (0.24mM).

Com caldria molta quantitat de fluid cefaloraquidi embrionari de ratolí per aïllar les lipoproteïnes per ésser ultracentrifugades seqüencialment, es va optar per avaluar electroforèticament.

Figura 6.- Electroforesi del plasma embrionari (*E-Plasma*) i FCR-E (*E-CSF*) de ratolí de dos tipus: *sa* (*WT*) i el deficient en el receptor de LDL (*K.O.*)



El que observem a la **Figura 6**), és que els lípids són transportats principalment per la **LDL**, tant en el plasma embrionari i com en el fluid cefaloraquidi embrionari. Tant en **WT** com per als deficients en receptor de **LDL (K.O.)**.

Com s'esperava, els ratolins mutats presenten més quantitat de **LDL** i **VLDL** al E-CSF, doncs al no tenir aquests ratolins el receptor d'aquest, "s'acumula" en el fluid cefaloraquidi.

5.-Conclusions.

En aquest article, diverses conclusions poden ser enunciades. Primerament, d'acord amb la neurogènesi, els resultats són coherents amb els "rols" descrits per aquestes lipoproteïnes, com transportadors de lípids, llavors, suplementadores **LDL** i **VLDL**, i els recicladors de lípids (**HDL**).

En segon lloc, tot i que s'ha observat que la concentració de lípids portada per la **VLDL** en el fluid cefaloraquídi embrionari (FCR-E) és **més gran** que la portada per la **LDL**, els explants cultivats amb **VLDL + FDL** presenten un nombre **inferior** de cèl·lules diferenciant a neurones. Això pot ser degut al fet que el neuroepiteli mesencefàlic en desenvolupament **no** presenti el **receptor** de les **VLDL**, com els resultats obtinguts en pollastres ho demostren.

Llavors, és raonable contemplar el fet que la lipoproteïna **VLDL** utilitzi receptors inespecífics per el "lliurament" de lípids i altres funcions. Es pot afegir, que el fet que el genoma dels pollastres no contingui el gen que codifica per l'**apolipoproteïna E** (apoE) pot ser una altra causa de la reducció en la diferenciació neuronal.

Tercer, encara que el **LDL** i en part el **VLDL** són capaços d'induir fins al 60% de la diferenciació neuronal, del total que indueix el contingut complet del FCR-E, no són capaços de mantenir un nivell suficient de **supervivència cel·lular**, si no és amb la presència del **LDF**.

El que indica, que factors continguts en el **FDL** són els responsables de la mateixa supervivència.

Tot i que hi ha factors de creixement en el FCR-E, només són responsables parcialment de la supervivència de les cèl·lules del neuroepiteli.

De tota manera, la combinació dels efectes de **LDF** amb una fracció lipoproteica o una altra, no és suficient per mantenir la proliferació cel·lular, mentre que el FCR-E amb la seva composició completa, si ho aconsegueix (conté, tots els tipus de lipoproteïnes) .

Finalment, les diferents respostes de diferenciació neuronal observades en la presència (o absència) de factors continguts en la **LDF** han de ser esmentades.

Els resultats indiquen que aquests factors, són responsables per a la regulació de la incorporació de lípids cap a l'interior de les cèl·lules del neuroepiteli.

En absència de **LDF**, les cèl·lules progenitores del neuroepiteli semblen ser capaces de respondre a qualsevol fracció aïllada de lipoproteïnes i diferenciar-se a neurones, encara que s'observi simultàniament més mort cel·lular programada.

D'altra banda, si ens acostem a les **condicions fisiològiques**, la incorporació de lípids pot restringir-se a factors continguts en la fracció **LDF**. Això vol dir, que encara que altres fraccions (**LDL**, **VLDL** ..) poden induir a les cèl·lules progenitores del neuroepiteli a ser beta3-tubulina positives (diferenciació a neurones), la regulació **completa** del procés neurogènic és **depenent** de la fracció **LDF**.

A més a més, cal tenir en compte l'estructura tridimensional del mateix teixit. Si recordem que estem estudiant les funcions del líquid que omple les "cambres secretes" o ventricles del cervell, l'efecte de les molècules del mateix actua sobre el "revestiment" de les cambres, o en aquest cas, les cèl·lules progenitores del neuroepiteli.

En els explants en cultiu, aquest efecte és unidireccional, el fluid subministrat "banya" en superfície de l'explant, de dalt a baix.

Així es pot dir, que el FCR-E és la font principal del colesterol, lípids i altres vitamines que són transportades per les lipoproteïnes, encara que, la diferència entre el explant (in vitro) i el context real, l'embrió, aquestes cèl·lules han rebre flux sanguini del teixit subjacent a neuroepiteli, el mesènquima.

Aquests resultats, sobre la diferenciació a neurona i supervivència cel·lular de cèl·lules progenitores del neuroepiteli pertanyents a ratolins deficitaris en el receptor LDL (**LDLR**), corroboren els resultats obtinguts en el neuroepiteli de pollastres. Permetent, estendre el paper de les **LDL** en la diferenciació durant la neurogènesi també en mamífers.

Aquests resultats mostren que encara que a nivell d'aparença externa dels ratolins deficitaris en **LDLR** no presenten problemes, mostren un subtil menor nombre de cèl·lules diferenciant, en comparació als ratolins sans.

Es pot especular, que els defectes sinàptics observats en els ratolins mutats adults, siguin una conseqüència d'això.

A nivell d'alteracions observades, els ratolins deficitaris del **receptor de LDL** tenien conseqüències menys dràstiques que en els explants de pollastre cultivats in vitro en absència de **LDL**.

És per això important destacar, que l'estudi de la rellevància fisiològica de certs receptors per separat, com el **LDLR**, implicat en el transport de lípids, és difícil a causa de les **funcions redundants**.

És a dir, altres receptors com el del **HDL** o **VLDL** poden solucionar la falta del **LDLR** amb activitat **no específica**; internalitzant molècules pròpies (l·ligands) del **LDLR**, acabant per "esmoreir" la seva absència.

Com a conclusió final, aquest article aporta noves idees sobre la diferenciació de les cèl·lules neuroepiteliales en ràpides etapes del desenvolupament embrionari, confirmant el paper del FCR-E en la diferenciació neuronal, com estudis previs havien descrit, però aportant evidències experimentals del paper crucial que sustenta l'**LDL** en aquest procés.

6.- Reflexió Final

És increïble pensar en el que implica dedicar-se a la Biologia del Desenvolupament. Com fa la Natura per passar d'una seqüència d'informació biològica, a un individu multicel·lular, amb estructures orgàniques complexes?

En altres paraules, com a partir d'una sola cèl·lula, obtenim un ésser format per milers de tipus cel·lulars? Aquí rau el Miracle o el Misteri.

La Dansa de les Cèl·lules és el primer nivell de la "opera" que s'està duent a terme.

La infinitat de molècules que hi ha dins de les cèl·lules, al seu torn, formen part de l'obra sense que amb prou feines percebem els seus moviments; i més encara, els fluids que les envolten, formant part de la Dansa com *attrezzo*, que contra tota intuïció deixen de ser-ho per actuar amb un paper principal.

La formació de les cambres "secretas" (ventricles) del cervell pel fluid que les omple, té un paper més important que el de les cèl·lules que formaran el mateix, ja que serà el fluid (FCR-E) el que amb les seves molècules, en una Dansa específica i coordinada entre diferents veus (tipus de apolipoproteïnes), determinaran i dirigint les cèl·lules per formar les estratificacions del cervell i al seu torn, l'epiteli específic que recobrirà les "parets" de les càmeres.

Lavors, la Dansa de la Cèl·lules, es basa en la dansa de les cèl·lules implicades en la mateixa, més la dansa de les biomolècules que les conformen, més la dansa dels fluids que omplen les seves cavitats ... una dansa de danses, en una mena de fractal infinit.

Com la nostra esfera primordial, en haver començat les seves primeres divisions mitòtiques.

El Misteri últim, se'ns planteja en la Biologia del Desenvolupament. La paradoxa esta formulada, davant dels nostres ulls. Doncs, nosaltres som la paradoxa:

Som la mateixa informació (codi genètic) que codificava l'esfera primordial que un dia vam ser, que ara, intenta comprendre's a si mateixa. En resoldre-la, es troba el Desafiament.

7.-Entrevista:

La Dra. Carolina Parada, actualment és investigadora posdoctoral al Centre de Biologia Molecular Craneofacial de la Universitat del Sud de Califòrnia, a Los Angeles (USA).

Es va llicenciar en Odontologia a la Universitat Nacional de Colòmbia (2000); amb Honors. Seguidament, va ser co-investigadora a l'Institut de Genètica (2003), de la mateixa universitat. Va realitzar el doctorat en Biologia (PhD, 2008) en el grup de desenvolupament de vertebrats, al Departament de Genètica de la Universitat de Barcelona, obtenint el *CUM LAUDE* (Tesi Excel·lent) juntament amb el Premi Extraordinari de Doctorat (2009).

1.- Ismaïl Hermelo (IH): Perquè Odontologia?

Dra. Carolina Parada (CP): Vaig començar la carrera d'odontologia als 16 anys. Durant els anys d'institut la meva assignatura preferida era biologia, però no volia estudiar biologia perquè pensava que hauria d'estudiar alguna cosa d'aplicació immediata. En aquest moment tenia en ment el futur, en les dificultats econòmiques que tenia la meva família i en com ser productiva també per a ells. Al final, la decisió que d'adolescent va ser bona, finalment sí que vaig estudiar biologia però especialitzada en el desenvolupament craniofacial, que és fascinant.

2.- (IH): Durant la carrera, com va ser l'assignatura que més esforç demandava per a tu?

(CP): En odontologia teníem assignatures purament tècniques que em semblaven a l'extrem avorrides i que demanaven moltíssim temps. Recordo les nits senceres sense dormir fent manualitats. Estèticament molt interessants i essencials pels odontòlegs clínics, però no per algú interessat en ciències bàsiques. A mi em va ajudar a decidir-me per la part biològica de la llicenciatura.

3.- (IH): Quin factor opines que era el que faltava, en aquesta assignatura?

(CP): Era més una qüestió de gustos que de dificultat de l'assignatura.

4.- (IH): Quin diries que és la responsabilitat del docent, en aquest cas?

(CP): Cap.

5.- (IH): En el moment d'especialitzar la teva carrera cap a una disciplina, ho tenies clar? Vas trigar molt en decidir-te? Quan ho vas veure clar?

(CP): Afortunadament a la meua universitat, l'últim any de carrera podíem escollir una "línia d'aprofundiment". Em vaig decidir per una anomenada Creixement i Desenvolupament Craniofacial. Va ser un any gratificant i molt productiu. L'interès per la biologia del desenvolupament va néixer aquí.

6.- (IH): Perquè el doctorat en Biologia? Perquè en Biologia del Desenvolupament i més concretament, en Biologia Craneofacial?

(CP): Abans de començar el doctorat, la meva formació era principalment clínica. En els últims anys de llicenciatura d'Odontologia (inclòs l'any de la línia d'aprofundiment) vaig tindre que fer rotacions en diversos hospitals de Bogotà. Vaig passar la major part del temps a l'Hospital Matern-Infantil. Allà vaig tenir l'oportunitat de seguir i aprendre d'un genetista en el seu treball diari amb nens amb malformacions congènites. Les malformacions craniofacials, incloent el llavi i / o paladar fendit, son molt freqüents i tenen un cost emocional i econòmic altíssim per al pacient i la seva família. Veure aquests nens va ser impactant i l'origen de la meva passió pel Desenvolupament Craniofacial. Després de tots aquests anys, els meus interessos han canviat i ara intento respondre preguntes més fonamentals en la biologia del Desenvolupament, però fent servir models animals que presenten malformacions craniofacials.

7.- (IH): No s'havien fet estudis centrats en la composició concreta del FCR-E. Un article teu previ, publicat a la revista *Proteomics* (el teu article més citat a dia d'avui), va mostrar per primera vegada un anàlisi proteòmic complet del FCR-E. Vas identificar 30 proteïnes diferents. La majoria d'aquestes eren conegudes per tenir funcions durant el desenvolupament embrionari, tot i que la funció individual de cadascuna d'elles mai va ser analitzada. Amb tot, d'aquestes 30, 14 es troben en adults. I curiosament, d'aquestes 14, 12 són conegudes per estar quantitativament i qualitativament alterades en malalties neurodegeneratives.

Va ser aquest context el que et va dirigir a realitzar l'article que s'ha explicat divulgativament?

(CP): Sí, el nostre objectiu en aquest i altres projectes era entendre com podrien actuar els components del FCR-E en diversos aspectes del sistema nerviós central en embrions de pollastre. Un dels criteris que vam fer servir per seleccionar les proteïnes que estudiaríem era la seva alteració en malformacions del sistema nerviós o en malalties neurodegeneratives. Entre les molècules identificades en el nostre estudi de proteòmica es trobaven transportadors de lípids, alguns dels quals estan alterats, en concentració o distribució, en pacients amb Alzheimer i altres desordres neurodegeneratius.

8.- (IH): Les premisses en què es basa, són sòlides. Que és el que et va fer pensar que el paper dels lípids provinents del FCR-E era més important que els que poguessin arribar pel sistema circulatori?

(CP): Molts dels components del FCR-E provenen del sistema circulatori. El transport de molècules de la sang al fluid està controlat estrictament per la barrera hemato-encefàlica, que apareix molt aviat durant el desenvolupament de l'embrió, com es va demostrar en un altre estudi realitzat en el laboratori del professor David Bueno. Per tant, no crec que es pugui dir que l'aspecte local és més important que el sistèmic, perquè un depèn de l'altre. El nostre objectiu, en tot cas, era estudiar el microambient al qual es troben exposats els progenitors neuroepiteliais.

9.- (IH): Es va analitzar la composició de lípids i lipoproteïnes en el FCR-E, per comparar entre d'altres amb el plasma de l'adult. Les diferències observades, ja apunten quina classe (o

classes) d'apolipoproteïnes poden estar jugant un paper regulador (Taula 1)). Els resultats van ser els esperats. Com determineu, per exemple, que els valors que surten fora del "rang esperat" de HDL per FCR d'embrió, no són fruit de la variabilitat entre individus?

(CP): El volum de FCR-E que s'obté de cada embrió és molt petit, la qual cosa ens obligava sempre a fer *pools* de fluid per a cada experiment. El nombre d'embrions utilitzat, bastant alt, ens permetia saber que els resultats eren estadísticament significatius i que les diferències trobades entre les condicions analitzades no eren producte de variabilitat inter-individus o de l'experiment, ja que cada un d'ells es va repetir tres vegades.

10.- (IH): A la Taula 2), observem que hi ha un pic a l'estadi HH27 de molècules lipídiques (Colesterol, Triglicèrids i Fosfolípids) que coincidint amb el període de màxima diferenciació dels progenitors de les cèl·lules neuroepiteliales. En aquest experiment, ja es podia afirmar que s'estaven corroborant les premisses? O encara podria ser això una conseqüència del període de màxima proliferació?

(CP): Els nostres resultats indiquen que els lípids de l'FCR-E contribueixen significativament tant amb processos de proliferació com diferenciació dels progenitors neuroepiteliales. La idea que els lípids contribueixen a la diferenciació neuronal no és nova. Hi ha ratolins amb mutacions en transportadors de lípids que presenten alteracions en el desenvolupament del sistema nerviós central. El pic que esmentes no sembla ser l'atzar i suggereix que els lípids de l'FCR-E podrien tenir una funció en diferenciació neuronal. No obstant això, els resultats obtinguts amb els cultius no ens permeten descartar que la disminució en diferenciació neuronal quan no hi ha lípids en el medi es degui al fet que la proliferació està alterada, i el pool de progenitors reduït. El model de ratolí tampoc ens va permetre ser concloents en aquest sentit.

11.- (IH): Perquè la variació del contingut del FCR-E suggereix una implicació funcional del mateix sobre les cèl·lules progenitores del neuroepiteli, i no és una conseqüència del mateix desenvolupament? No podia ser això una conseqüència de la màxima activitat del neuroepiteli i / o l'inici de la diferenciació neuronal?

(CP): Les dues opcions són possibles. En el passat, el FCR-E es considerava com un dipòsit de cèl·lules mortes, de molècules que haurien de ser rebutjades i / o producte de processos metabòlics. Però el nostre treball i el d'altres grups ha demostrat la importància de proteïnes i lípids provinents del FCR-E en el control del destí cel·lular dels progenitors neuroepiteliales així com en l'establiment del patró del sistema nerviós central. També s'ha demostrat, mitjançant l'ús de models animals, que l'FCR està implicat en el control de la neurogènesi en adults (*paper* publicat a *Science* el 2006). La majoria de resultats en estadis embrionaris provenen d'estudis *in vitro*. És essencial l'ús de models animals per confirmar les nostres observacions.

12.- (IH): A nivell experimental, que era més complicat per a tu, l'obtenció del FCR-E o l'obtenció de explants de neuroepiteli prou homogenis?

(CP): L'ús d'embrions com a model ens facilitava l'execució dels experiments, per la gran disponibilitat de mostres. Tots dos procediments, extracció de FCR-E i cultiu de neuroepiteli, eren relativament fàcils. En l'obtenció del fluid sempre havíem de tenir cura de no contaminar

amb cèl·lules o amb sang perquè això podria modificar els resultats, especialment en l'anàlisi del contingut proteic. Els cultius no eren perfectament homogenis però prou com per usar-los per provar les nostres hipòtesis, obtenint resultats fiables i replicables.

13.- (IH): A la Figura 3 A) s'observa clarament que el LDF és qui promou la supervivència neuronal. Em sembla significatiu que una sola fracció estigui implicada en la supervivència, així es garanteixen efectes solapats. Es pot considerar que el fet que només el LDF obtingués els valors del Control, com un tipus de mecanisme de seguretat?

(CP): Al LDF està tot el contingut proteic del FCR-E, a excepció dels transportadors de lípids, per la qual cosa no és sorprenent que controli funcions tan importants com la supervivència. En un altre estudi, el nostre grup va demostrar, utilitzant mètodes *in vitro* i *in vivo*, que el FGF2 del fluid promou la proliferació dels progenitors neuroepiteliais. Segurament que hi ha més factors de creixement involucrats en la regulació d'aquest procés que no vam poder identificar amb les tècniques disponibles en aquest temps.

14.- (IH) Et sembla plausible, que l'efecte del LDL "tot sol" sobre el neuroepiteli, no es vegi incomplet pel model del explant *in vitro*? És a dir, el LDL sol (Figura 3 A), induïx diferenciació i proliferació, però també mort. Pot ser que sigui a causa del fet que li falta el mesènquima a explant?

Argument basat en què LDL + LDF (Figura 3 B) mostra diferenciació, supervivència, però no proliferació.

(CP): Com vaig esmentar abans, els nostres estudis *in vitro* han generat una gran quantitat d'informació que ha de ser corroborada amb l'ús de models animals. Amb els cultius estem ignorant les funcions de totes les estructures i teixits circumdants, que malauradament no es poden incloure en el explant, per limitacions tècniques. Pel que fa a la teva pregunta específica, no es va incloure mesènquima en cap dels experiments que es presenten a les figures 3A i 3B, incloent el explant control exposat al FCR-E complet. Encara que no incloem altres teixits, les funcions cel·lulars en els explants cultivats amb FCR-E són comparables a la situació *in vivo*. Per tant, els nostres resultats suggereixen que en presència d'altres proteïnes, la LDL estaria induïnt diferenciació dels progenitors i inhibint proliferació. La pregunta seria com interactua la LDL amb altres proteïnes del fluid per controlar els diferents processos cel·lulars analitzats.

15.- (IH) El paper del receptor del LDL (a part del VLDLR) s'ha analitzat. Si lo transportat per les LDL no s'internalitza al neuroepiteli, no serviria de res la presència de lípids diversos al FCR-E. Amb tot, un dubte sorgeix del raonament.

Perquè no és el mateix, analitzar la manca d'una apolipoproteïna, que el defecte en un receptor?

Si la apoproteïna no està, encara que estigui present el receptor, no hi haurà lliurament de lípids. En canvi, sabem que hi ha unió inespecífica en els lligands dels receptors (sobretot en mamífers), o redundància. En altres paraules, qui acaba determinant l'entrada de lípids, són els receptors.

(CP): És veritat, però la redundància funcional s'aplica tant a lligands com a receptors. En altres sistemes, per exemple a la regió craneofacial, mutacions en Bmpr1a són compensades pel Bmpr1b. És probable que passi el mateix en el cas de receptors per lipoproteïnes i altres transportadors de lípids.

16.- Els resultats en ratolins mutats, tot i ser no significatius, estan en concordança amb els obtinguts en pollastres. Els ratolins deficitaris en receptor de LDL, tenen menys diferenciació que els normals. El mateix per a la supervivència, els ratolins mutats tenen més cèl·lules Caspasa-3 activa positives (moren més). Creus que tot i la redundància de lligands, amb moltes més rèpliques s'haurien obtingut dades concloents també en mamífers?

(CP): No crec, el nombre d'embrions inclòs en les anàlisis era estadísticament significatiu. És freqüent que no hi hagi fenotips severos *in vivo* per compensació. Per comprovar-ho es haurien de generar dobles mutants.

17.- A nivell de recerca en general, quina és la teva opinió sobre realitzar part de la teva carrera científica a l'estranger?

(CP): Parlant des de la meua experiència personal, per mi va ser particularment important mudar-me a un altre país perquè vaig néixer en un lloc amb pobres recursos econòmics per a investigació. A Colòmbia és molt complicat fer experiments complexos, no per falta de persones capacitades o d'interès, però per dificultats financeres i burocràcia extrema. A Catalunya vaig tenir el meu primer acostament real a la biologia del desenvolupament i vaig obtenir alguns resultats interessants. Però crec que ha estat als Estats Units és a on m'he sentit millor com a investigadora. Treballar amb gent provinent de diferents països, amb estils d'investigació diferents i diferent *backgrounds* realment ajuda a tenir una visió més àmplia dels problemes d'investigació i per construir la teua "personalitat" com a científic. No crec que això es pugui aconseguir quedant-se en el mateix grup, a la mateixa ciutat o en el mateix país. De la mateixa manera, l'experiència fora del laboratori ha estat molt interessant i enriquidora, tant a Barcelona com a Los Angeles.

18.-Quina consideres que és la diferència més gran entre la teua experiència als Estats Units i els teus anys de doctorat a la nostra Facultat?

(CP): Una resposta semblant a l'anterior. Els recursos econòmics són la principal diferència entre Catalunya i els Estats Units. També sóc més madura ara i puc aprofitar millor el que s'ofereix aquí. Per a qualsevol científic és molt gratificant poder planejar experiments i portar-los a terme sense restriccions de cap tipus, així com tenir tecnologia de punta a l'abast de la mà. Això realment permet provar diferents hipòtesis i considerar tots els aspectes que influeixen en un procés en particular. Al final, tenir recursos elimina una gran part de l'estrès i fa possible gaudir del treball diari.

19.- Que penses que hauria de millorar en la investigació científica a Catalunya?

(CP): El potencial de Catalunya és impressionant i així ho va mostrar abans de la crisi econòmica, quan es van construir nous centres d'investigació i es va incrementar el nombre de publicacions en *high impact factor journals*. Amb això està tot dit.

20.- Algun consell que et poguessis donar a un "jo" teu del passat, que t'hauria agradat escoltar?

(CP): Un consell general seria preocupar-me menys pel futur, al final ha anat millor del que es pensava. Potser hauria pogut estudiar biologia des d'un principi ...

21.-I del passat, al futur. Has pensat alguna vegada a fer el salt cap a l'empresa privada, o tens pensat seguir amb la carrera científica?

(CP): No m'interessa l'empresa privada, no hi ha espai per fer preguntes fonamentals en biologia. Realment no tinc un gran coneixement de com funciona però el fet que generar diners sigui una prioritat, li dóna un toc negatiu. Continuaré en acadèmia fins quan sigui possible.

Moltes gràcies Dra. Carolina.

8.-Bibliografia:

Bibliografia:

- Parada C., Escolà-Gil J.C. and David Bueno (2008) Low-density Lipoproteins From Embryonic Cerebrospinal Fluid Are Required for Neural Differentiation. *Jornal of Neuroscience Research* 86:2674-2684.
- Parada C., Angel Gato, Mariano Aparicio and David Bueno (2006) Proteome Analysis of Chick Embryonic Cerebrospinal Fluid. *Proteomics*, 6, 312-320.
- Scott F. Gilbert (2013) *Developmental Biology* 10th Edition.

Il·lustracions:

www.ismailhermelo.com

9.-Agraïments:

Agraïm al Dr. David Bueno pels seus suggeriments i temps i a la Dra. Carolina Parada per participar en l'entrevista.