

La danza de las Células

Ismail Hermelo Akhtar

1.- La Biología del Desarrollo o La Danza de las Células.

Un punto. Una circunferencia casi perfecta en el medio de la nada. Una coordenada como referencia en un sistema de tres dimensiones. Una esfera, y no una cualquiera...la esfera Primordial.

Bajo una luz suave, nuestra esfera se revela translúcida y observamos que esta llena de una sustancia muy similar a un gel. Si seguimos escudriñando pacientemente, veremos que este "gel" esta lleno de componentes inmersos en una actividad frenética. De pronto, un escalofrío hace que la esfera se contraiga en su interior y brota una línea que parece su propio radio, que lentamente, sigue creciendo hasta formar el diámetro de la misma. Con un movimiento tan sutil como elegante, la esfera primordial no solo ha determinado las dos partes de las que esta formada, sino que se ha dividido en dos.

Maravillados por ver tan inesperado evento, hallaremos que no es el único, mas será el primero, de una larga lista de divisiones que experimentara la esfera primordial que estamos observando. Llevara a cabo tantas, de hecho, que perderemos la cuenta más allá de la treintava división; donde la esfera previa casi perfecta, llena de gel, habrá dado paso otra llena de pequeñas esferas similares a la original, en una suerte de fractal o calidoscopio de si misma.

Ara que el número de esferas interiores va incrementándose, más allá de las cien, podremos apreciar la extrema coordinación de todas las esferas interiores. No hay nada al azar, al menos en el campo visible. Los movimientos son tan suaves como precisos, similares en gracia i belleza a cualesquiera Danza Tradicional. Tan elegantes, que se puede nombrar como la Danza de las Células.

1.1.-La embriogénesis

Como se habrá intuido, nuestra esfera primordial es el cigoto, la célula resultante de la unión de los dos **gametos**, las células que fusionan sus núcleos respectivos durante la concepción (**fertilización**) en los organismos de reproducción sexual.

En el caso del género humano, el gameto femenino es el **óvulo** mientras que el gameto masculino es el **espermatozoide**. Se trata de unas células que contienen la mitad de información o **contenido genético** (DNA, ácido desoxirribonucleico) que las células que forman los individuos de la especie (ergo son **haploides**). Una vez fusionados los núcleos, o mejor dicho, dado el tamaño del óvulo respecto al del espermatozoide, una vez el gameto masculino penetra en el femenino, la célula resultante es el cigoto, donde ahora suma el contenido genético de sendos progenitores (es **diploide**) conteniendo la información necesaria para iniciar uno de los procesos biológicos más impresionantes como Misteriosos de la Naturaleza: el desarrollo a partir de **una** sola célula de un organismo hecho de miles de millones de células (organismo multicelular), constituido no por un solo tipo de células, sino por todo un seguido de linajes celulares tan diversos como especializados para la tarea a llevar a cabo, en el nuevo individuo que formaran "literalmente".

Este es el proceso biológico que comprende desde la fertilización hasta la formación del embrión, la **embriogénesis**. Una vez alcanzada la primera etapa del desarrollo, pasa a nombrarse feto, hasta el momento del alumbramiento.

Centrándonos en la primera etapa del desarrollo, partiendo del estadio unicelular, los procesos que tienen lugar determinan el futuro del individuo. Como en toda danza, cualquier error en un paso, se puede recuperar fácilmente siguiendo adelante como si nada. Empero, y si en la danza intervienen centenares de individuos o, millares? La coordinación debería de ser excepcional, dado que el error de uno solo podría propagarse peligrosamente e comprometer la ejecución de todos como grupo. Lo mismo pasa en el cigoto, donde las divisiones que se producirán han de ser perfectas y, como más células la formen, más relevancia tienen.

1.2.-Primeras fases de la embriogénesis.

Para tener una idea visual de este increíble proceso, explicaremos de forma general las fases que llevan a la formación del embrión, dando cierto énfasis a puntos del desarrollo embrionario que trataremos en la investigación realizada en la facultad.

Conceptos previos:

Mitosis: cuando una célula se divide, produce dos células nuevas. El contenido genético de las mismas, determina que tipo de división ha realizado la célula original. Si ha realizado una mitosis, las células hijas tienen exactamente el **mismo** contenido genético que la célula original; eso es, que la célula se a dividido en dos, previamente ha duplicado su contenido genético o DNA, a fin de poder repartir a partes iguales el DNA en las células hijas.

El caso contrario, es el de la **meiosis:** en el que la célula original no duplica su contenido genético, de manera que en dividirse, las células hijas tienen la **mitad** de DNA que la célula de

la cual provienen. Este tipo de división celular, por ejemplo en humanos, se da en las células precursoras de los gametos. Entre otras ventajas, este tipo de división, favorece que la información genética que contiene cada gameto, sea solo una parte de la información completa del individuo. Eso es positivo, porque favorece la **recombinación** de la información genética, es decir, evita que la información genética se redunde, al formar un nuevo individuo.

Hablando desde un punto de vista genético, la repetición de información conlleva ciertos riesgos, como las enfermedades hereditarias no dominantes. La unidad hereditaria más elemental del código genético es el **gen**, que no es más que un fragmento del código genético que codifica todos los elementos necesarios para su expresión regulada. Este fragmento de código (o **secuencia de nucleótidos**) tiene la información necesaria para la síntesis de una macromolécula, con una función celular específica (proteínas, ácidos nucleicos mensajeros "ARNm", de transferencia ARNt..etc.).

Muchas enfermedades (sobre todo, las no dominantes o **recesivas**), requieren de más de una copia por gen para poder manifestarse en el individuo, como es en el caso de descendientes de progenitores de la misma familia, endogámicos (información genética que aunque se da la recombinación, los gametos que se unen tienen el contenido genético demasiado cercano o similar). Cada progenitor, aporta una de las dos secuencias presentes en cada cromosoma, y si cada copia contiene la información genética que conlleva la enfermedad (en caso de ser recesiva), esta se manifestará en el individuo.

La recombinación hace que cada descendiente sea diferente al anterior, aunque compartan el mismo sexo y progenitores. Como en toda regla, hallamos la excepción: los gemelos. Aunque existen de dos tipos, los univitelinos (**monozigóticos**) y los bivitelinos (**dizigóticos**); los primeros son los más famosos, los que probablemente inspiraran la expresión: "como dos gotas de agua".

Los gemelos monozigóticos, provienen de un mismo cigoto, nuestra "esfera primordial", que se divide en "dos" cigotos. Es diferente tener, un cigoto unicelular que se divide en dos células, es decir, que el cigoto está formado por **dos células**, a tener **un** cigoto unicelular que se divide en **dos cigotos** unicelulares que seguirán con las divisiones mitóticas propias del desarrollo (el cigoto se ha reproducido **asexualmente**).

1.3.- El compás celular o Las fases de la embriogénesis en humanos.

Empieza el baile. La primera etapa del desarrollo es la **segmentación**, y es común para todos los organismos pluricelulares. Es el proceso que hace pasar de **una** sola célula, a un embrión hecho de **miles** de ellas:

Después de la fecundación, ya se puede nombrar a la célula **cigoto**. La primera división mitótica da a lugar a dos **blastómeros**. A partir de la tercera división simultánea de blastómeros (12-16 células) tiene lugar la **compactación**, que determina una "cavidad" interior que dará lugar al embrión y una "región" exterior o **trofoblasto** que formará los tejidos anexos del embrión.

Estos tejidos comienzan como membranas. El trofoblasto dará lugar a la parte de la placenta correspondiente al embrión, y la cavidad rodeada o **celoma**, origina dos membranas mas, el **Corion** y el **Amnios**, que a su vez, rodean al embrión en formación.

Una vez, el cigoto “anida” en el útero, comienza a entrar **fluido** en los espacios existentes entre las células, confiriéndole al mismo una posición polar. Este fluido, se ira concentrando en una cavidad dentro de la esfera que aún es el embrión, hasta formar una única cavidad, con las células que forman el embrión apretadas en un extremo. Esta es, la Primera cavidad, una suerte de Capilla Sixtina, en la que las pinturas de Miguel Ángel son las células del futuro individuo. Una vez el embrión está implantado, tiene lugar la **pregastrulación**, en la que las células del embrión se ordenan en dos niveles o estratos: el **Epiblasto** y el **Hipoblasto**. Esto quiere decir, que el embrión está formado ahora por dos capas o tipos de células (**embrión bilaminar**).

En el **Epiblasto**, o mejor dicho, a partir de las células que lo forman, surgirán las tres capas embrionarias : **Ectodermo**, **Mesodermo** y **Endodermo**.

El proceso que sigue al descrito, es la **gastrulación**. Se trata de la formación de una “entrada” o hendidura, llamada neuroentérica, uniendo las cavidades del saco vitelino y la cavidad amniótica. Las células que forman el epiblasto, empiezan a dividirse en gran numero (**prolifera**n) y se introducen en la línea primitiva, como “grupos exploradores de células”, que forma “campamentos” en lugares diferentes del embrión, en una coordinación mas propia de la estrategia militar.

Las células que “penetran” en el hipoblasto, el estrato que subyace, formarán el **Endodermo embrionario**. Las que permanecen entre “ambos planos”, entre el Epiblasto y el Hipoblasto, formarán el **Mesodermo embrionario**. Otras forman una especie de “dorsal” en el mismo epiblasto, y serán las progenitoras del **Ectodermo embrionario**.

Que son estas tres “capas” embrionarias?

Primero de todo, se trata de estratos celulares o **laminas** (también conocidas como capas germinativas). Gracias a la **gastrulación**, se pasa de un embrión formado por dos laminas, a un trilaminar. Las células que forman cada una de estas laminas, son las precursoras (o progenitoras) de todos los linajes celulares especializados que conformaran los tejidos.

Empezando por la capa mas interna o **Endodermo**, de forma general, es la precursora del sistema respiratorio, hígado, páncreas y del aparato digestivo (curiosamente, sin incluir la boca, la faringe y la parte final del recto).

En segundo lugar tenemos el **Mesodermo**. El mismo, como se ha explicado, se forma por el desplazamiento previo al hipoblasto de las células diferenciadas del epiblasto, que migran para formar un cúmulo de células entre las dos laminas, hasta formar una nueva, el Mesodermo. Entonces, podemos decir que las células del mesodermo provienen de células que han hecho mitosis de la lamina “de encima”, o epiblasto. La lamina progenitora del Ectodermo. Existen varias clases de tejidos que se formarán a partir del Mesodermo, que a su vez, originaran distintos tejido internos (o mesenquimales). A resaltar, el **mesodermo cordado**, que dará lugar

a la **notocorda**: órgano temporal (transitorio) que entre otras funciones promueve la formación del tubo neural y el eje antero-posterior. También destacar, el **mesodermo dorsal somítico**: que por la formación de unos precursores de extremidades llamados **somitas**, a lado y lado del tubo neural, formará tejidos como el cartílago, el músculo, la dermis o el esqueleto.

Y el último de todos, el **Ectodermo**. Hablando cronológicamente, es la primera lámina germinal del embrión. En vertebrados, el ectodermo se divide a su vez en tres partes: ectodermo externo, las Células de la Cresta Neural y el Tubo Neural. Dando lugar a estructuras tan diversas como la piel y lo que crece en la misma, así como el sistema nervioso (periférico por la cresta neural y central por el tubo neural).

Es interesante destacar, que entre una de las capas del ectodermo, están las células que formarán la boca. No es trivial. De cierta manera, entre las células que son las progenitoras del sistema nervioso, están las que darán lugar a la boca. Es como relacionar directamente, la capacidad genético-cerebral del habla, con la formación del “aparato” emisor de la misma. Una relación que aún ser un nexo destacado por el autor, no deja de ser curioso (pues a nivel de estructura boca-faringe, las ratas podrían hablar; sólo les falta el llamado, “gen del habla”).

Así, cada una de las tres capas formarán y darán paso a las estructuras que dotarán al embrión de órganos, en un proceso llamado **organogénesis**. Que procesos celulares, de forma general, se producen en cada una de las etapas mencionadas? El crecimiento y diferenciación. Se tratan del mismo proceso?

Durante el **crecimiento**, hablamos de activación de genes que hacen que haya **más** células (mitosis). Por el contrario, en la **diferenciación**, la **regulación** de la **expresión génica** tiene el papel principal. La regulación génica, confiere las propiedades diferenciales a una célula para distinguirla entre las otras. Como claramente se ve, la respuesta a la pregunta es que No, no es lo mismo. Lo que sí es cierto es el vínculo entre los dos términos, dado que ambos conforman el desarrollo biológico.

1.4.- Quien fue el primer biólogo del desarrollo?

La respuesta es más que sorprendente. Personalmente diría que se trata de toda una lección de los Grandes Pensadores del pasado. Aristóteles! De hecho, la respuesta a esta pregunta se podría especificar aún más, pues Aristóteles fue el Primer Biólogo o Fundador de la Biología y padre de la Lógica. Aunque existen estudios previos documentados, son a partir de él que se hayan estudios sistemáticos en ambas disciplinas.

Hablando sobre la Biología del desarrollo, Aristóteles publicó en el año 350 a.C. un libro titulado: “La Generación de los Animales” en la que enunciaba el concepto de la **Epigénesis** como proceso que explicaba el desarrollo de los embriones. Entonces, un organismo esta construido de nuevo y no parte de estructuras preformadas. En otras palabras, que **en** los gametos masculino y femenino, **no** existen versiones microscópicas de los órganos, tejidos que formarán el individuo, sino que se forman de nuevo partiendo del cigoto unicelular, no diferenciado. Pues son las señales externas las que inducen a la formación de los órganos del embrión.

2.- La Biología del desarrollo en la Facultad de Biología.

Una vez visto como son de importantes las primeras horas del cigoto, podemos intuir la relevancia que tienen los estudios que se centran en desentrañar cuáles son los mecanismos que regulan tal proceso. Las repercusiones de los mismos son directas sobre el bienestar de la población, pues conocer los misterios de esta danza celular, conlleva saber en profundidad sobre lo que nos forma y, en caso de enfermedad heredada o adquirida, saber con certeza que se puede hacer y que no.

Así, ahondar algo más de detalle, a parte de un reto estimulante, puede ser la respuesta a la pregunta más elemental: como estudian esto?

En la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona, en el departamento de genética, existen varios grupos de investigación que centran sus esfuerzos en esta especialidad y entre ellos, esta el Dr. David Bueno.

El Dr. David es docente en la Facultad de Biología tanto a nivel de grado como máster, investigador en el departamento de Genética, coordinador (responsable) de las pruebas de acceso a la universidad (PAU) y las pruebas de acceso a la universidad para mayores de 25 años, ambas del Consejo Interuniversitario de Catalunya.

Como investigador, es director de tesis doctorales. Es aquí donde introducimos a la ahora Doctora Carolina Parada. Previamente estudio Odontología en la Universidad Nacional de Colombia y seguido encaminó su futuro hacia la investigación científica, aplicando para la plaza ofertada en aquel momento por el Dr. David.

No se trata en ningún caso, de medir la calidad de una tesis por la cuantía de artículos científicos, si no más por el impacto en la ciencia que tengan los que se hayan publicado. El parámetro para medirlo, son las veces que se cita el artículo en sí por otros científicos, de ahí el "impacto". Como es obvio, sólo el tiempo puede responder con seguridad sobre la repercusión del artículo.

Empero, existe otra manera (aunque menos fiable que el tiempo) de prever la relevancia del mismo, y esta es, en "que" revista se publica, dado que no todas gozan del mismo prestigio académico. Generalmente, cuanto más prestigio, más estricto el escrutinio al que se somete el artículo para tal de aceptar o rechazar su publicación.

Una vez dicho esto, la Dra. Carolina como estudiante de doctorado realizó una tesis brillante. Y no sólo por la calidad de la investigación (o impacto), si no por la cantidad: Cinco artículos.

En lugar de hablar superficialmente sobre cada uno de ellos, nos centraremos en uno, para presentarlo en detalle.

3.-El fluido cefalorraquídeo.

Todos tenemos la imagen del cerebro, incluido dentro del cráneo de una forma muy similar a como se halla la nuez dentro del cascarón. Como metáfora sirve, pero es una imagen lejana a la real. De hecho, una muy deshidratada. Lo que hace del sistema craneal una protección tan efectiva para el cerebro son varios factores, entre ellos el líquido en el que esta de alguna forma, inmerso.

Este líquido es el cefalorraquídeo. Un líquido transparente que envuelve el encéfalo y la médula espinal. El cerebro no es una masa tejido maciza, sino que posee unos huecos o cámaras, llamadas ventrículos. Estas "cámaras secretas" que también están conectadas entre sí, están llenas de fluido cefalorraquídeo, pues se forma en las mismas. Principalmente en una región llamada los **plexos coroideos** (en humanos).

Al ser una superficie interna, las células que forman el revestimiento (el **epitelio**) de la cámara son especiales, pues están sobre tejido conectivo, no nervioso (como en el caso de la medula espinal). En términos generales, estas células fuertemente unidas forman la **tela coroidea**, que en replegarse, forma los **plexos coroideos**. Estos a su vez, están repletos de capilares sanguíneos. Filtran el plasma de la sangre, y lo liberan en modo de secreción a los ventrículos como el fluido cefalorraquídeo (FCR). Desde los ventrículos que lo forman, discurrirá hacia los siguientes por los agujeros que los conectan, hasta recorrer la superficie del encéfalo.

Las funciones generales del FCR, a parte de amortiguar como se ha introducido, es eliminar metabolitos del sistema nervioso y en cierto grado aportar micronutrientes, pero de forma suplementaria. También, como canal de transmisión de ciertas hormonas, como la de la **glándula pineal** (nuestro reloj biológico).

3.1.- Funciones desconocidas del Fluido cefalorraquídeo (FCR).

Un fluido encargado de tantas cosas para con el sistema nervioso y la relación íntima que con este mantiene, implica de alguna manera, regulación sobre él. Al menos eso debió pensar la Dra. Carolina cuando estudió los componentes del mismo, durante las primeras etapas del desarrollo embrionario.

Durante las primeras fases del desarrollo, justo cuando se acaba de formar el **neuroporo**, se produce la formación de lo que será el futuro cerebro, estructuralmente hablando, junto con sus "camaras secretas". Durante este mismo proceso, estas cavidades son llenadas con el fluido del **tubo neural**, conocido como fluido cefalorraquídeo embrionario (ó fluido cerebroespinal embrionario, influido del inglés: *embryonic cerebrospinal fluid*; E-CSF).

Se han descrito varias funciones del FCR-embrionario en cuanto a regulación del desarrollo cerebral, tanto a nivel embrionario como fetal. El FCR-embrionario, como se ha descrito, esta en contacto directo con las "paredes" de los futuros ventrículos del cerebro. Las células que revisten estas paredes son las **neuroepiteliales**. Entre las funciones del FCR-embrionario, está la de ejercer una presión positiva (es decir, "empujar") contra las paredes de los ventrículos, de modo que expande la cavidad de los mismos. También promueve la supervivencia, proliferación e diferenciación de las células progenitoras de las neuroepiteliales; también controla la formación de capas neuronales en el córtex y la proliferación a nivel fetal.

Estas funciones reguladoras, se ven reforzadas por datos obtenidos del fluido cefalorraquídeo (FCR) en el momento de **máxima proliferación** de las células progenitoras de las neuroepiteliales de embriones y fetos, tanto de gallinas, ratas y humanos, que incluyen las mismas moléculas proteicas descritas durante el desarrollo de otros sistemas.

Entre las proteínas halladas en el FCR de pollos, ratas y humanos están las de la familia de las **apolipoproteínas**.

Que son las apolipoproteínas?

Son las proteínas que contienen lípidos (la moléculas que forman la grasa) y a su vez, los transporta en el torrente sanguíneo. Esta familia de proteínas esta compuesta por varios tipos: ApoA, ApoB..etc. Las apolipoproteínas al unirse forman una macromolécula llamada **lipoproteína**. Gracias a la presencia de las apolipoproteínas que forman la estructura de la lipoproteína, son reconocidas por receptores específicos de determinados tipos celulares. Dada esta función, las apolipoproteínas tienen un papel importante en el metabolismo lipídico (de las grasas).

En adultos, las apolipoproteínas más abundantes son las **HDL** (*high density lipoproteins*: Lipoproteínas de alta densidad) y las **LDL** (*low density lipoproteins*: Lipoproteínas de baja densidad).

A parte de transportar lípidos, están implicadas en la formación de la **sinapsis** (la conexión más importante entre dos neuronas, la que transmite el impulso nervioso), la regulación del crecimiento de **neuritas** (cualquiera de las proyecciones de membrana que observamos en las neuronas, ese aspecto de “estrella”, son neuritas, hasta que una crece más que las otras, dándole un aspecto similar a un “cometa”; la cola del cometa deja de llamarse neurita, ahora es el **axón** de la neurona).

Metabolismo de lípidos, implicado en el desarrollo del sistema nervioso?

Entonces, que ocurre si esto falla? En embriones se ha descrito que defectos en la biosíntesis y transporte del colesterol, transporte de lípidos, o defectos en el ensamblaje de las lipoproteínas (apolipoproteínas+lípidos) conlleva alteraciones en la formación y funcionalidad en el Sistema Nervioso Central (SNC). De la misma manera, deficiencias en los **receptores de lipoproteínas**, quienes se encargan de entrar los lípidos y el colesterol dentro de la célula, producen efectos similares sobre el SNC.

Se puede afirmar, que el SNC durante las primeras etapas del desarrollo, depende **críticamente** del aporte continuo de moléculas de colesterol.

3.2.-Las premisas.

Tenemos por un lado, el aporte necesario de moléculas lipídicas y colesterol para un desarrollo normal del SNC, entonces, si las proteínas transportadoras (como las apolipoproteínas) no son funcionales, se asocian a defectos en el desarrollo.

En un estudio, se demostró con ratones deficientes de la apolipoproteína **ApoB** (obtenidos por ingeniería genética, *knockouts*) mueren durante las primeras fases del desarrollo, mostrando un crecimiento dispar en tejidos derivados del neuroepitelio. Es importante destacar, que la ApoB es la proteína mayoritaria de las **LDL** (*Low density lipoprotein*: proteína de baja densidad) y de la **VLDL** (*Very Low Density Lipoprotein*: Proteína de muy baja densidad), ambas responsables del transporte lipídico del plasma hacia los tejidos.

Paralelamente, están los receptores celulares, como se han comentado. Estos se expresan también en el embrión mientras se forma, ergo tienen un papel importante en el transporte lipídico del embrión. La mayoría de los receptores identificados forman parte de la familia de genes de los receptores **LDL**, que tienen como ligandos (las moléculas que en este caso, se unen a los receptores) las apolipoproteínas **apoB** y **apoE**, con sendos papeles relevantes en la entrada intracelular de los lípidos.

Luego, basándose en estas potentes premisas, el argumento de que las lipoproteínas tienen un papel fundamental en la regulación del sistema nervioso durante las primeras etapas del desarrollo, es más que sólido.

Así, la Dra. Carolina analizó el contenido lipídico y lipoproteico del fluido cefalorraquídeo embrionario (FCR-E) en gallos y ratones (tanto en ejemplares sanos, como en deficientes en el **receptor LDL**, es decir, **LDLR**: *Low density lipoprotein receptor*). También se analizó el papel de estas lipoproteínas en etapas primarias de la neurogénesis.

4.- Resultados.

4.1.-Composición del fluido cerebroespinal de pollos.

Utilizando técnicas de análisis de **contenido en proteínas** (proteomas), estudios previos realizados por la Dra. Carolina, analizaron los proteomas tanto en aves como mamíferos. La diferencia más importante fue que el contenido de proteico perteneciente a la familia de las

apolipoproteínas, era mayor en ratas. Tenían los dos grupos presentes en los pollos, mas tres, es decir, en total **cinco** tipos de apolipoproteínas diferentes.

TABLA 1) Estudio en pollos de la composición de Lípidos e Lipoproteínas en el plasma de un individuo adulto*(Adult Plasma), plasma embrionario(E-Plasma) y fluido cefalorraquídeo embrionario (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 |

Donde **VLDL**: *Very Low Density Lipoprotein*; Lipoproteína de muy baja densidad.

LDL: *Low Density Lipoprotein*; Lipoproteína de baja densidad.

HDL: *High Density Lipoprotein*; Lipoproteína de Alta densidad.

Lipoprotein-depleted fraction (LDF): Fracción restante al eliminar la lipoproteína.

Como se ha introducido, las apolipoproteínas tienen un rol básico en el transporte de lípidos y el FCR-embrionario tiene un papel determinante durante la neurogénesis; por ello, como primer paso, para ver las funciones de estas proteínas en la neurogénesis se analizó el contenido lipídico y proteico del pollo en los estadios indicados *, **, ***.

Utilizando métodos de ultracentrifugación (separación de componentes en base a su diferente densidad) se aislaron por una parte, las lipoproteínas y por otra, la fracción lipídica (colesterol y triglicéridos) que “transportaban”. También la concentración total de proteínas.

Se analizó el plasma de pollos adultos para confirmar la validez de la metodología utilizada, y así fue. Las cantidades obtenidas son las descritas en la bibliografía científica previa, para un pollo sano. Como se observa en la **tabla 1**), la lipoproteína mas abundante en el adulto es el **HDL** (7.28mM, “mM = milimolar”) junto con la mayoría del colesterol unido a la **LDL** (3.85mM). Si observamos el contenido de triglicéridos en el plasma embrionario (9.02mM, valor obtenido sumando la concentración de triglicéridos de todas las fracciones: VLDL+LDL+HDL+LDF), veremos que son mucho mas abundantes que en comparación al plasma del adulto (0.49mM, valor obtenido realizando la misma operación).

Otra diferencia a resaltar, es el contenido total de colesterol en el plasma del embrión de pollo (a 24 horas de desarrollo="HH24", 2.03mM) que es claramente menor al contenido plasmático del adulto (8.02mM).

Gracias al hecho de separar cada clase de molécula y su carga (en este caso triglicéridos o colesterol) se pudo acotar las diferencias entre el plasma embrionario y el del pollo adulto. Esto es, que el patrón lipoproteico, aunque globalmente se cuantifiquen las diferencias, afinar y ver **que** moléculas son las que producen esta diferencia de valores. Observando la **tabla 1)** vemos que el plasma embrionario tiene mayor proporción de **VLDL** y **LDL** (10.46mM; sumando ambas VLDL+LDL para sus valores de colesterol y triglicéridos) en comparación al plasma del adulto(4.51mM). En esta diferencia, vemos claramente quien potencia la misma: el contenido en triglicéridos llevados por la **VLDL** (7.51mM).

En el plasma embrionario **tabla 1)**, como se esperaba, se observan unas cantidades muy bajas de colesterol referido al **HDL** (0.08mM) en comparación al plasma del adulto (3.85mM). Además, también se esperaba observar una menor concentración en la **LDF** perteneciente a colesterol + triglicéridos (0.23mM); ya que la fracción más grande en la **LDF** fue la proteica (3.32mM).

Fijándonos ahora en la composición plasmática global de colesterol y triglicéridos del FCR-Embrionario a 24 de horas gestación "HH24" (1.37mM) era menor en comparación al contenido global del plasma perteneciente del adulto (8.51mM). En cuanto al contenido en colesterol e proteínas los valores fueron muy parecidos; por ejemplo, para el colesterol los valores de **VLDL** eran (0.40mM) y para **LDL** eran (0.36 mM). Se puede remarcar que la mayoría de los triglicéridos se obtuvieron del **VLDL** (0.21mM, de los 0.42mM totales, eso es, la mitad unidos **sólo** a la **VLDL**).

Si comparamos el contenido lipídico (colesterol + triglicéridos) para **HDL** (0.19mM) en el FCR-E con el contenido lipídico unido al **HDL** en el plasma del adulto (3.99mM), observamos claramente que es menor. Lo mismo ocurre con los valores de proteína para **HDL**, (0.02mM en plasma FCR-E), mientras que en el plasma del adulto (7.28mM).

Esto es, **poca** presencia de **HDL** en el plasma del FCR-E.

Para confirmar estos resultados que muestran un patrón lipoproteico claro, se prosiguió con otra técnica experimental llamada electroforesis.

4.2.- Electroforesis de los fluidos obtenidos en cada estadio.

El gel electroforético, se basa en un principio muy sencillo. La estructura molecular de las proteínas, tienen átomos (o grupos de ellos) con carga eléctrica (esto es, en un sistema +/-, o polaridad positiva o negativa, como los polos de un imán). Si en un extremo de la estructura hay un átomo "cargado" positivamente, y en la cercanía (a nivel atómico) hay otro cargado negativamente, las "cargas" se compensan, así la carga global de la proteína es cero. A esto, se le llama el **Punto Isoeléctrico (P.I.)**. Cuando una proteína tiene diferentes cargas, que no se compensan entre sí, (por ejemplo: dos negativas e una positiva) decimos que la carga global de la proteína es **negativa**.

El gel de electroforesis, que no es más que una matriz de polímero de carga "neutra" que se asemeja a una "red" molecular, se sumerge en agua y se le hace pasar una corriente eléctrica (fuerza electromotriz), con lo que las proteínas en función de su "carga global", migran más o menos en dirección al ánodo (polo negativo). Así, la electroforesis juega con este principio (P.I.), junto con el **tamaño** y la **forma** (estructura terciaria) de las proteínas.

Otro factor que se puede "modular" en pro de las características de la proteína a aislar (por ejemplo, si es muy pequeña), es el tamaño de los poros del gel; simplemente, variando su densidad.

Que ocurre si las proteínas buscadas están en el (P.I.)?

La unidad básica de una proteína son los aminoácidos. Si nos imaginamos la proteína como una **cadena** de aminoácidos, su estructura tridimensional se forma a partir de enlaces entre átomos presentes en aminoácidos lejanos en cuanto a secuencia, que pueden establecer esta unión gracias a que la "cadena" se repliega sobre si misma. Es por ello que se forma la estructura tridimensional (terciaria) proteica, que "acerca" grupos de signo opuesto confiriéndole carga global neutra. Ergo la fuerza electromotriz no les afecta (no migran).

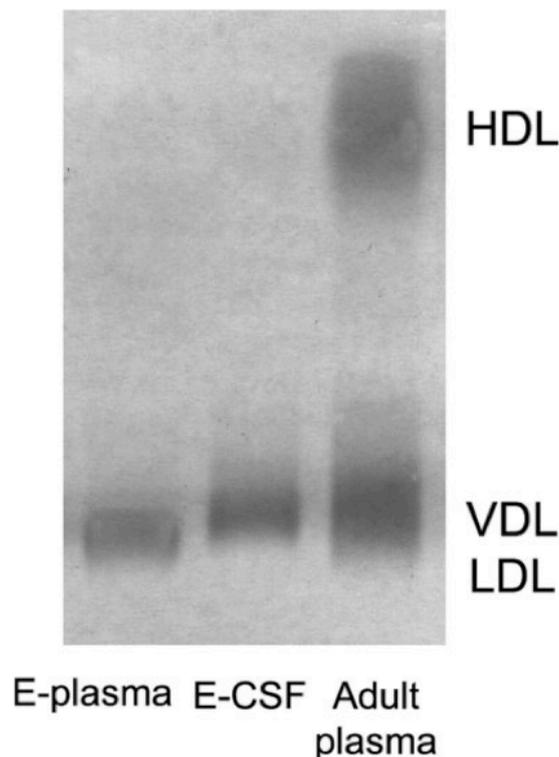
Entonces mediante el añadido de agentes reductores, se logra desnaturalizar a las proteínas. Se produce la "rotura" de enlaces formados entre átomos lejanos. La **cadena** de aminoácidos, se "despliega". Lo que se conoce como conformación **nativa**.

Resumiendo, el agente reductor "corta" los enlaces desplegando la estructura y el detergente carga la proteína negativamente (cuanto más grande sea, más carga negativa global). Así, la proteína se desplazará en relación directa a su **tamaño**, pero en dirección al polo positivo (cátodo). Cuanto más grande es la proteína, más lentamente se desplaza.

Las proteínas con las mismas propiedades, migrarán aproximadamente la misma distancia. Acumulándose en la misma sección del gel. Esto es, una maraña de proteínas acumuladas una cerca de la otra, formando un tipo de red. Si teñimos las proteínas, fácilmente observaremos su posición en el gel. A estas "manchas" (cúmulo de proteínas) se conocen como "bandas" de proteína.

En la **Figura 1**), los fluidos obtenidos en cada uno de los estadios: plasma embrionario (E-plasma), plasma de Fluido Cefalorraquídeo-Embrionario (E-CSF, en la figura) y plasma adulto (Adult plasma) fueron insertados en un gel electroforético para la separación de los diferentes lipoproteínas presentes en el plasma.

Figura 1) Gel electroforético de las lipoproteínas obtenidas del Plasma de pollos en los estadios (adulto: Adult plasma; embrionario: E-plasma; Fluido cefalorraquídeo embrionario: E-CSF).



Donde, **HDL** (*High density Lipoprotein*: Lipoproteína de alta densidad)
VDL (*Very Low Density Lipoprotein*: Lipoproteína de muy baja densidad)
LDL (*Low density lipoprotein*: Lipoproteína de baja densidad)

La base del rectángulo de la imagen, es hacia donde migran las proteínas. Con todo lo que se ha explicado, podemos intuir que las que han “llegado” hasta el “final”, son las más pequeñas y livianas. En este gel, son la **VDL** y la **LDL**.

Que lectura podemos obtener del gel?

Que confirmamos los resultados observados en la **Tabla 1)** para el E-CSF (FCR-E, en castellano). Como se observa también en la **Figura 1)**, los lípidos en el fluido cefalorraquídeo son transportados principalmente por la **VDL** y la **LDL**. Por otra parte, comparando con el plasma del adulto, prácticamente no se observa “banda” correspondiente a la **HDL**, mientras que en el plasma del adulto se observa nítidamente.

Como el efecto del FCR-E sobre las células neuroepiteliales varía durante el tiempo, se procedió a analizar si el contenido lipídico e lipoproteico varía durante el desarrollo.

TABLA 2) Composición lipídica del E-CSF (FCR-E) durante el desarrollo.

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 obtenido a diferentes estadios de desarrollo: **HH20, HH24, HH27** y **HH29**. Se analizó para cada uno de ellos, el contenido en Colesterol, Triglicéridos y Fosfolípidos.

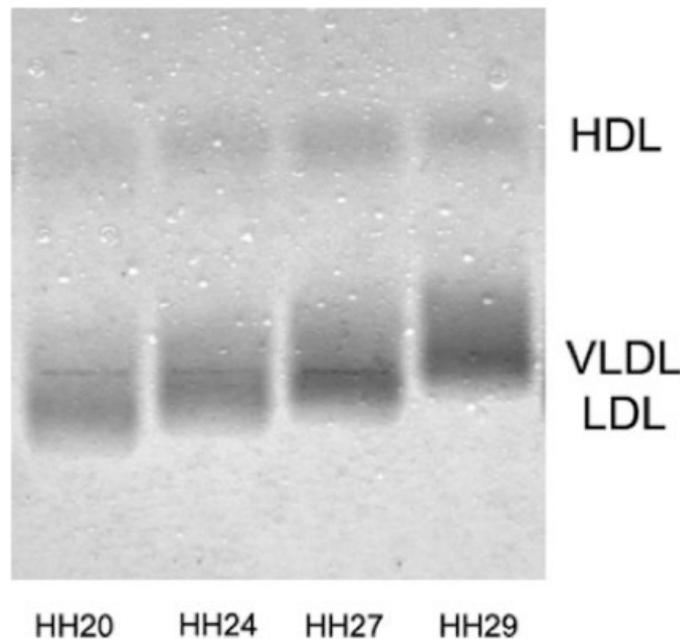
A destacar, observamos en la **Tabla 2)** como el aumento de las tres variables entre los estadios **HH20** y **HH27**, coincidiendo con el periodo de máxima diferenciación de las células progenitoras neuroepiteliales.

Una vez alcanzado el nivel milimolar (mM) a **HH27**, tanto para el colesterol, triglicéridos y fosfolípidos, los valores no varían de manera sustancial.

Como ejemplo, para los triglicéridos, en la **Tabla 2)** en el estadio **HH27** es 0.95mM y para el estadio **HH29** es 0.95mM, igual.

Seguidamente, también se volvió a realizar otro gel de electroforesis para observar el patrón lipoproteico de los mismos estadios que en la **Tabla 2)**.

Figura 2) Gel de electroforesis del contenido del FCR-Embrionario en los estadios de desarrollo HH20, HH24, HH27 y HH29 (los mismos que en la Tabla 2)).



Donde, **HDL** (*High density Lipoprotein*: Lipoproteína de alta densidad)
VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*: Lipoproteína de muy baja densidad)
LDL (*Low density lipoprotein*: Lipoproteína de baja densidad)

Con una técnica diferente, siempre hay más probabilidad de explorar **otros** factores que con un solo análisis no refleja. Como es en el caso del patrón de “bandas” observado en la **Figura 2)**, donde vemos que desde el estadio **HH20** al **HH29** la banda correspondiente a **VLDL** y **LDL** varía de manera sustancial. Vemos como las bandas, aumentan su intensidad. A parte, la autora observo que la bandas, migraban mas “rápido”.

Diametralmente opuesto, el caso de la **HDL**, que no varía en los diferentes estadios.

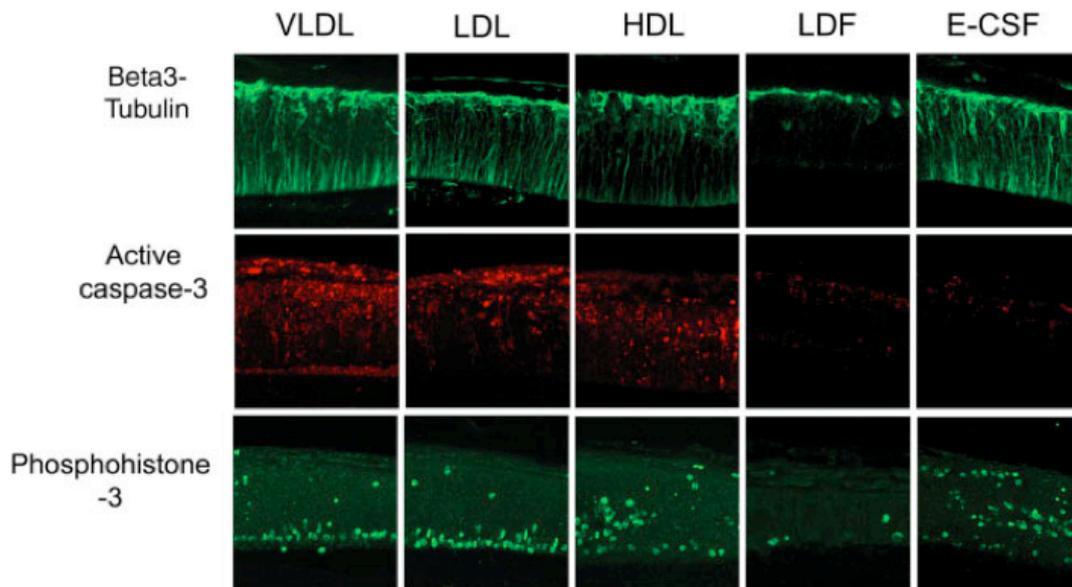
Como las etapas de desarrollo embrionario estudiadas incluyen las de máxima actividad de las células progenitoras del neuroepitelio y la del inicio de la diferenciación neuronal, estos resultados que muestran como el contenido del FCR-E se modula y varía a largo del mismo, sugieren una **implicación funcional** de los lípidos contenidos en el fluido cefalorraquídeo durante la neurogénesis.

4.3.- Papel de las fracciones lipoproteicas del FCR-E en pollos sobre la diferenciación de las células progenitoras del neuroepitelio.

Para estudiar la contribución de los lípidos y las lipoproteínas inmersas en el FCR-E a la neurogénesis, se procedió al cultivo organotípico de explantes del neuroepitelio mesencefálico. Esto es, a diferencia del concepto intuitivo de cultivo celular, en el cual las células se cultivan “disgregadas”, en el cultivo organotípico se coloca in vitro a una porción (o **explante**) mismo del tejido o órgano a estudiar. Esto permite mantener las relaciones “estructurales” entre las diferentes capas de células que lo forman, de modo que el explante permite estudiar la composición y las relaciones “**en**” el tejido; pues reacciona a los estímulos del modo mas similar al que haría en el organismo.

A nivel de laboratorio, se sabe que para mantener la supervivencia e inducir la proliferación y diferenciación neuronal a nivel de cultivo celular, el FCR-Embrionario es **suficiente**. Así el cultivo con medio químicamente definido junto con el contenido total del FCR-E, se usó como el control positivo. Se consiguió la inducción máxima de la neurogénesis. Como control negativo, se cultivaron los explantes sólo con el medio químicamente definido.

Figura 3A) Análisis de la neurogénesis, supervivencia neuronal y proliferación en explantes neuroepiteliales mesencefálicos de pollo. Imágenes representativas del neuroepitelio de pollo inmunomarcadas cultivadas en diferentes condiciones.



Donde, las siglas en la parte superior indican los medios de cultivos con presencia de:

VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*: Lipoproteína de muy baja densidad)

LDL (*Low density lipoprotein*: Lipoproteína de baja densidad)

HDL (*High density Lipoprotein*: Lipoproteína de alta densidad)

Lipoprotein-depleted fraction (LDF): Fracción restante al eliminar la lipoproteína.

Beta3-tubulin (Beta3-tubulina): Se marcó la Beta3-tubulina, como marcador de inducción neuronal (ampliamente utilizado como marcador de neuronas).

Active Caspase 3 (Caspasa Activa 3): Indicador de "muerte" celular; analizando la supervivencia.

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

Como se puede observar en la **Figura 3 A)**, la inducción a neuronas fue analizada marcando con fluorescencia la Beta3-tubulina. Los medios suplementados con **VLDL**, **LDL** ó **HDL** mostraron niveles de inducción prácticamente iguales al control positivo (FCR-E). En esta fila, cabe destacar la reducción de inducción neuronal en la presencia de medio suplementado con **LDF**, en comparación al control positivo.

Previamente, se ha introducido que el FCR-E esta implicado tanto en la supervivencia como la diferenciación neuronal; por ello se analizo si estos parámetros celulares (supervivencia y diferenciación) son independientes en los explantes cultivados. El análisis de las supervivencia por medio de la Caspasa Activa-3 mostró que los explantes suplementados con **VLDL**, **LDL** ó **HDL** tenían más apoptosis (muerte) que el control positivo (a más florescencia roja, mas muerte).

Por otra parte, los explantes cultivados con **LDF**, mostraron pocas células con Caspasa Activa-3, como en el control positivo, en otras palabras, morían **menos** células (más supervivencia).

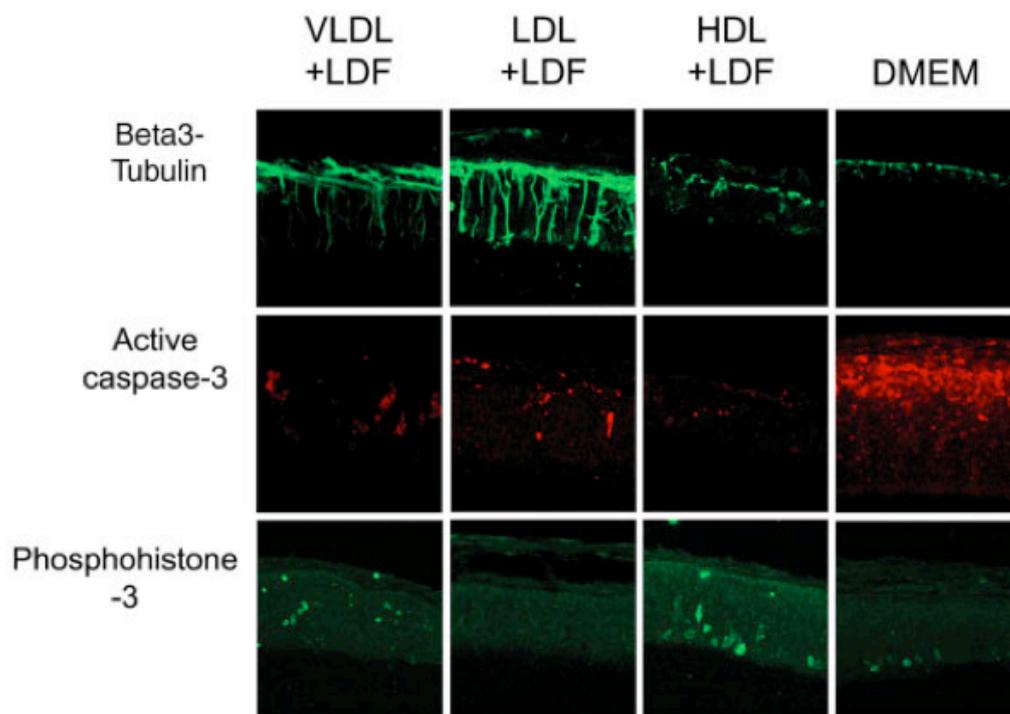
En cuanto a la proliferación neuronal, los explantes cultivados sea con **VLDL**, **LDL**, **HDL** ó **LDF** mostraron pocas células fosfohistona-3 positivas (es decir, que se han marcado con fluorescencia) en comparación al control positivo.

Estos resultados **sugieren**, que algunos factores presentes en la **LDF** están implicados estrechamente en la supervivencia celular; sin tener las mismas, en la ausencia de lípidos, un papel en la diferenciación ni en la proliferación.

Para analizar la validez de este argumento, de que componentes ó factores que se hallan en la fracción restante al eliminar la lipoproteína (**LDF**) promueven la supervivencia celular en "ausencia" de lípidos, se prosiguió a combinar los efectos del mismo con las distintas fracciones lipoproteicas (**VLDL**, **LDL**, **HDL**). Eran capaces de inducir la diferenciación neuronal junto con la presencia de los factores presentes en el LDF?

Así se cultivaron los explantes, en medios con las fracciones lipoproteicas **mas** el LDF.

Figura 3B) Análisis de la neurogénesis, supervivencia neuronal y proliferación en explantes neuroepiteliales mesencefálicos de pollo. Imágenes representativas del neuroepitelio de pollo inmunomarcadas, cultivadas en diferentes condiciones.



Donde, las siglas en la parte superior indican los medios de cultivos con presencia de:

VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*: Lipoproteína de muy baja densidad)+ **LDF** (*Lipoprotein-depleted fraction*: Fracción restante al eliminar la lipoproteína).

LDL (*Low density lipoprotein*: Lipoproteína de baja densidad) + **LDF**

HDL (*High density Lipoprotein*: Lipoproteína de alta densidad) + **LDF**

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*; Un medio de cultivo comercial de composición química definida; este es el Control Negativo).

Beta3-tubulin (Beta3-tubulina): Se marco la Beta3-tubulina, como marcador de inducción neuronal (ampliamente utilizado como marcador de neuronas).

Active Caspase 3 (Caspasa Activa 3): Indicador de "muerte" celular; analizando la supervivencia.

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

Se puede resaltar de la **Figura 3 B**), la diferenciación neuronal inducida por la presencia de la fracción lipoproteica de **LDL+LDF**, que es prácticamente el 60% (porcentaje facilitado por la autora) de la inducción lograda con el control positivo (medio suplementado junto con la composición completa del fluido cefalorraquídeo embrionario (FCR-E)). Es ilustrativo observar la diferencia entre el explante cultivado con **LDL Figura 3 A**) y el explante cultivado con **LDL+LDF**. Lo que se puede decir observando estos resultados, es que la Lipoproteína de baja densidad (**LDL**) es la fracción lipoproteica mayoritaria que contribuye a la neurogénesis.

Por otra parte, a nivel de **supervivencia**, observamos que la actividad caspasa-3 ahora es muy baja, como se observa en el control positivo, y en los explantes cultivados **sólo** con **LDF**(este último, en la **Figura 3A**)).

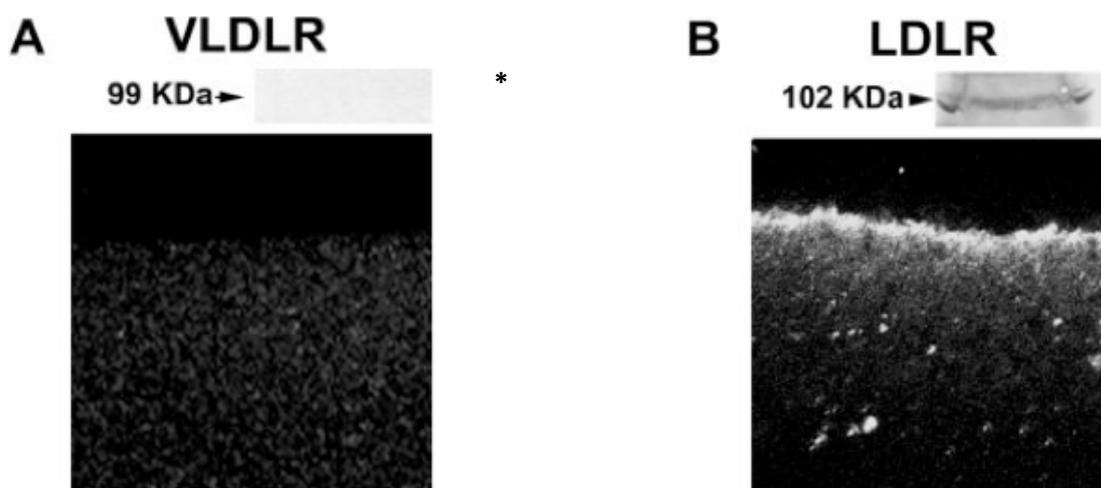
En cuanto a proliferación, observamos una reducción en el número de células fosfohistona-3 positivas, en comparación a las cultivadas con el (FCR-E) completo.

4.3.- Presencia del receptor de LDL y VLDL en el Neuroepitelio mesencefálico.

Como hemos visto, la suplementación en el medio de cultivo del explante con **LDL+LDF** induce la diferenciación neuronal en un gran número de células. Aunque a nivel de cantidad de proteína, correspondiente a cada tipo de apolipoproteína (**VLDL, LDL** o **HDL**), en el embrión de pollo la **VLDL** es la fracción más concentrada (0.05g/L), mientras que la **LDL** (0.04g/L), datos de la **Tabla 1**).

Como ambas son lipoproteínas transportadoras de lípidos, se buscó analizar el **receptor** de las mismas, localizados en el neuroepitelio mesencefálico de pollo.

Figura 4.- Análisis por Western Blot de la presencia del Receptor del VLDL (VLDLR) Recuadro superior* (lo mismo para el receptor de LDL) y marcación por fluorescencia del VLDLR en un explante (lo mismo para el receptor de LDL).

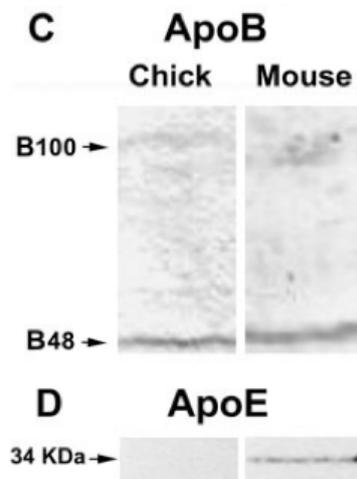


Como se observa en la **Figura 4.-A**) *, no se observa banda de proteína perteneciente al receptor **VLDL**. Se señala con una flecha la región (o sección del gel) en la que generalmente “llegan” las proteínas con un peso molecular de 99KDa. Gracias a que muchas proteínas están caracterizadas, entre otras cosas, por su peso molecular, es muy fácil observar la región del gel en la que “supuestamente” debería ser visible la banda, en ser teñida. A más a más, se marcaron explantes de neuroepitelio mesencefálico con inmunofluorescencia y tampoco se obtuvo señal del receptor.

En la **Figura 4 B)**, ocurre exactamente lo contrario. Si aparece la banda proteica correspondiente al receptor de **LDL** y al marcarse con fluorescencia, se observa el neuroepitelio repleto de **receptores de LDL**.

Como se conoce en estudios previos, entre otras lipoproteínas que forman las **VLDL** y las **LDL**, esta la **apoproteína B (apoB)**. Se sabe que la apoB es una lipoproteína crucial en la entrega de lípidos por vía receptor celular. Un estudio previo de la Dra. Carolina, describió por primera vez que la proteína **apoB** esta presente entre el fluido cefalorraquídeo embrionario, a partir con un análisis proteómico adecuado. Si se realizara el western blot, sin saber previamente que la **apoB** esta en el FCR-E, la banda en la región “esperada” podría ser cualquier otra proteína que tuviera el mismo peso molecular.

Figura 4.C) Western Blot para detectar la presencia de la apoproteína B en el FCR-E en estadio HH24 en pollos (izquierda) y en estadio E12.5 en ratón (derecha). Figura 4.D) Western Blot para detectar la presencia de la apoproteína E en el FCR-E en el estadio HH24 en pollos (izquierda) y en estadio E12.5 en ratón (derecha).



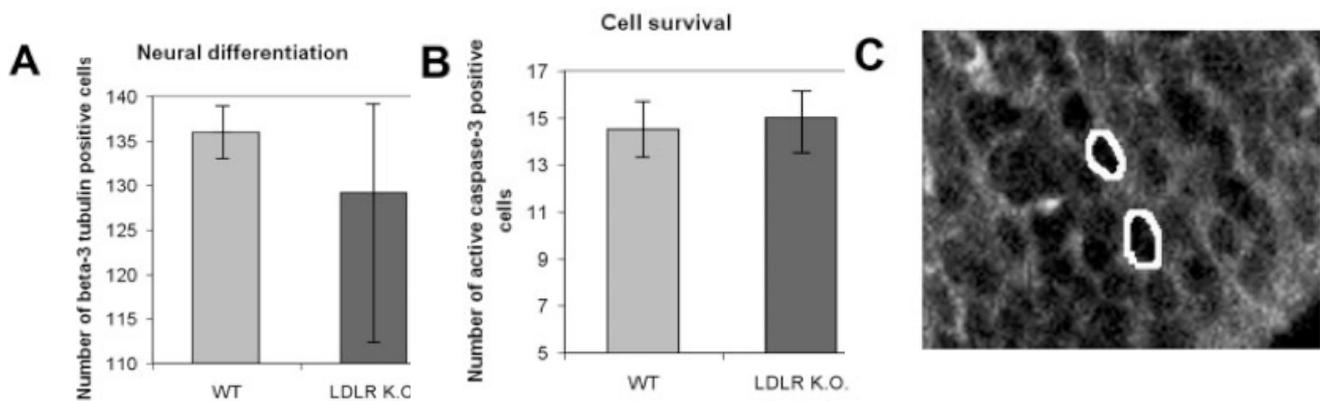
Como podemos observar en la **Figura 4.C)**, en el recuadro de la izquierda, la banda perteneciente a la apoproteína B aparece, y sus dos isoformas también (formas en las que se encuentra). En cuanto a la **Figura 4.D)** recuadro de la izquierda, vemos que **no** aparece la banda correspondiente a la **apo E**. Lógico, teniendo en cuenta que en el genoma del pollo no se halla el gen para esta proteína.

En cambio para ratón, aparecen tanto la banda de la apoproteína B como la de la apoE, codificadas ambas en el genoma de los ratones.

Como vemos, tenemos una implicación clara de **LDL** en la **neurogénesis**, y siendo estudiado principalmente en pollos. Para corroborar los resultados en mamíferos, se procedió a analizar la diferenciación neuronal en el neuroepitelio del mesencéfalo y telencéfalo de ratones.

Se analizaron dos clases de ratones: unos normales (sanos, o en inglés: “*Wild type*”: Variedad Salvaje) y los ratones manipulados (modificados) genéticamente, que **no** tienen el receptor del LDL (**LDLR**), en (inglés: “*LDL KO mice*”; ratones que no tienen el gen que codifica para el **receptor del LDL**). Cabe decir, que estos ratones mutados, aun y **no** tener el **receptor de LDL**, se desarrollaron con aparente normalidad.

Figura 5.- Estudio de diferenciación (A), supervivencia neuronal (B) e imagen (C) mostrando el criterio de identificación de las células Beta3-tubulina positivas.



Donde, **WT**: *Wild type*: Ratones variedad Salvaje (Normal).

LDLR K.O.: *LDL receptor Knock Out*: Ratones deficientes en el receptor LDL.

Como podemos observar en la **Figura 5 A)**, el gráfico que muestra los valores medios de células Beta3-tubulina (marcador de diferenciación a neurona) en la que se haya una diferencia no significativa entre los dos grupos de datos. La línea en la parte superior de cada columna, indica la **desviación estándar**, esto es, la variabilidad de los valores introducidos o **rango de valores**.

Para poder afirmar que hay diferencias entre dos o más grupos de valores, estas líneas no deben **solaparse**. En el caso de la **Figura 5 A)**, vemos que la desviación estándar es tan amplia que se solapa con la de la columna a la izquierda, ergo la diferencia observada **no es concluyente**.

Lo mismo ocurre en el análisis de células Caspasa-3 positivas (supervivencia) **Figura 5 B)**, las diferencias observadas entre los ratones normales y los deficientes en **receptor LDL** no son significativas.

La **Figura 5 C)**, nos muestra el criterio para contar las células beta3-tubulina positivas; las células subrayadas con blanco son las negativas (no brillan).

Estos resultados obtenidos en los ratones para el **LDLR KO** respaldan los obtenidos en pollos, referentes a la inducción neuronal, que indicaban que el **LDL** esta implicado en la diferenciación neuronal, pero no en la supervivencia celular.

Lo observado en mamíferos **sugieren** una función similar (en diferenciación, vemos que en los deficientes para **LDLR** tienen menos diferenciación “lo esperado” pero **no** significativo), aunque la complejidad inherente del sistema lípido/lipoproteína en mamíferos hacen de los resultados no concluyentes.

Con esta información respectiva a las células progenitoras del neuroepitelio deficientes en **LDLR**, se prosiguió con en análisis lipídico y lipoproteico de estas dos variedades de ratón (la normal y la mutada para el **LDLR**).

TABLA 3) Estudio dos tipos de ratones, *Wild-type mice* (ratón sano, normal) y *LDL receptor-deficient mice* (ratón deficitario en receptor LDL), de la composición de Lípidos e Lipoproteínas en el plasma de un individuo adulto (*Adult Plasma*), plasma embrionario (*E-Plasma*) y el fluido cefalorraquídeo embrionario (E-CSF).

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

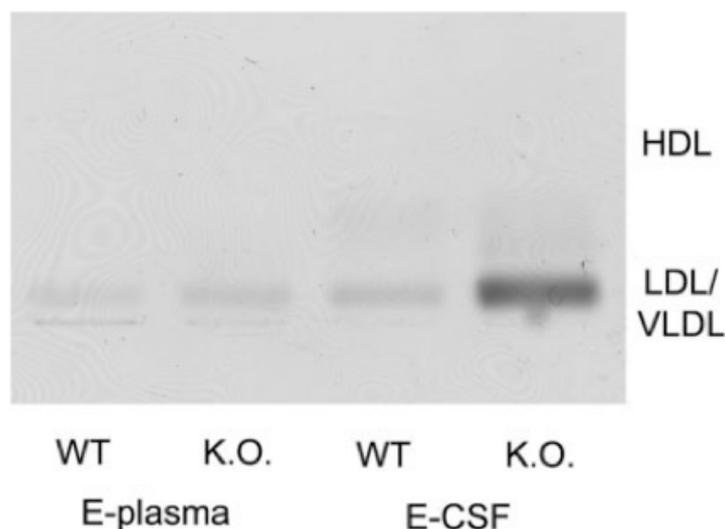
| | Cholesterol (mM) | Triglycerides (mM) | Phospholipids (mM) |
|-----------------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|
| Adult plasma | | | |
| Wild-type mice | 1.66 | 0.47 | 2.27 |
| LDL receptor-deficient mice | 5.43 | 0.78 | 4.12 |
| E-Plasma | | | |
| 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 |

Como se ha publicado ya en la literatura científica, los ratones deficitarios en el **receptor LDL** presentan un aumento del colesterol y fosfolípidos en plasma, e un leve incremento de triglicéridos en comparación a los ratones normales. Como se puede observar, tanto en el FCR-E (E-CSF en la **Tabla 3**) como en el plasma embrionario de los ratones normales (*Wild-type mice*) presentan unos valores inferiores para los tres parámetros en comparación al adulto. Lo mismo ocurre con los ratones **mutantes LDLR**, donde los valores obtenidos del plasma embrionario y el FCR-E son menores al adulto mutado.

Destacar que el contenido de colesterol y fosfolípidos embrionarios es superior que en los embriones de los ratones normales. Por ejemplo, el colesterol en el **FCR-E** de los ratones **LDLR KO** (0.40mM) es claramente mayor al equivalente sano (0.24mM).

Como haría falta mucha cantidad de fluido cefalorraquídeo embrionario de ratón para aislar las lipoproteínas e ultracentrifugarlas secuencialmente, se optó por evaluarlo electroforéticamente.

Figura 6.- Electroforesis del plasma embrionario (E-Plasma) y FCR-E (E-CSF) de ratón de dos tipos: sano (WT) y el deficitario en el receptor de LDL (K.O.)



Lo que observamos en la **Figura 6**), es que los lípidos son transportados principalmente por la **LDL**, tanto en el plasma embrionario y como en el fluido cefalorraquídeo embrionario. Tanto en **WT** como para los deficientes en receptor de **LDL (K.O.)**. Como se esperaba, los ratones mutados presentan mas cantidad de **LDL** y **VLDL** en el E-CSF, pues al no tener estos ratones el receptor del mismo, se “acumula” en el fluido cefalorraquídeo.

5.-Conclusiones.

En este artículo, varias conclusiones pueden ser enunciadas. Primeramente, de acuerdo con la neurogénesis, los resultados son coherentes con los “roles” descritos para estas lipoproteínas, como transportadores de lípidos, entonces, suplementadores **LDL** y **VLDL**, y los recicladores de lípidos (**HDL**).

En segundo lugar, aunque se ha observado que la concentración de lípidos llevada por la **VLDL** en el fluido cefalorraquídeo embrionario (FCR-E) es **mayor** que la llevada por la **LDL**, los explantes cultivados con **VLDL+FDL** presentan un numero **inferior** de células diferenciándose a neuronas. Esto puede ser debido al hecho que el neuroepitelio mesencefalico en desarrollo **no** presente el **receptor** de las **VLDL**, como los resultados obtenidos en pollos lo demuestran.

Entonces, es razonable contemplar el hecho de que la lipoproteína **VLDL** utilice receptores inespecíficos para la “entrega” de lípidos y otras funciones. Se puede añadir, que el hecho de que el genoma de los pollos no contenga el gen que codifica para la **apolipoproteína E (apoE)** puede ser otra causa de la reducción en la diferenciación neuronal.

Tercero, aunque el **LDL** y en parte el **VLDL** son capaces de inducir hasta el 60% de la diferenciación neuronal, del total que induce el contenido completo del FCR-E, **no** son capaces de mantener un nivel suficiente de **supervivencia celular**, si no es con la presencia del **LDF**. Lo que indica, que factores contenidos en el **LDF** son los responsables del mismo.

A pesar de que hay factores de crecimiento en el FCR-E, solo son responsables parcialmente en la supervivencia de las células del neuroepitelio. De todas formas, la combinación de los efectos de **LDF** con una fracción lipoproteica o otra, no es suficiente para mantener la proliferación celular, mientras que el FCR-E con su composición completa, si lo consigue (contiene, todos los tipos de lipoproteínas).

Por último, las diferentes respuestas de diferenciación neuronal observadas en la presencia (o ausencia) de factores contenidos en el **LDF** deben ser mencionadas. Los resultados indican que estos factores, son responsables para la regulación de la incorporación de lípidos hacia el interior de las células del neuroepitelio.

En ausencia del **LDF**, las células progenitoras del neuroepitelio parecen ser capaces de responder a cualquier fracción aislada de lipoproteínas y diferenciarse a neuronas, aunque se observe simultáneamente más muerte celular programada. Por otra parte, si nos acercamos a las **condiciones fisiológicas**, la incorporación de lípidos puede restringirse a factores contenidos en la fracción **LDF**. Esto quiere decir, que aunque otras fracciones (**LDL**, **VLDL**..) pueden inducir a las células progenitoras del neuroepitelio a ser beta3-tubulina positivas (diferenciación a neuronas), la regulación **completa** del proceso neurogénico es **dependiente** de la fracción **LDF**.

A más a más, hay que tener en cuenta la estructura tridimensional del propio tejido. Si recordamos que estamos estudiando las funciones del líquido que llena las “cámaras secretas”

o ventrículos del cerebro, el efecto de las moléculas del mismo actúa sobre el “revestimiento” de las cámaras, o en este caso, las células progenitoras del neuroepitelio. En los explantes en cultivo, este efecto es unidireccional, el fluido suministrado “baña” en superficie el explante, de arriba abajo.

Así se puede decir, que el FCR-E es la fuente principal del colesterol, lípidos y otras vitaminas que son transportadas por las lipoproteínas, aunque, la diferencia entre el explante (in vitro) y el contexto real, el embrión, estas células deben recibir flujo sanguíneo del tejido que subyace al neuroepitelio, el mesénquima.

Estos resultados, sobre la diferenciación a neurona y supervivencia celular de células progenitoras del neuroepitelio pertenecientes a ratones deficitarios en el receptor LDL (**LDLR**), corroboran los resultados obtenidos en el neuroepitelio de pollos. Permitiendo, extender el papel de las **LDL** en la diferenciación durante la neurogénesis también en mamíferos.

Estos resultados muestran que aunque a nivel de apariencia externa los ratones deficitarios en el **LDLR** no presentan problemas, muestran un sutil menor número de células diferenciándose, en comparación a los ratones sanos. Se puede especular, que los defectos sinápticos observados en los ratones mutados adultos, sean una consecuencia de ello.

A nivel de alteraciones observadas, los ratones deficitarios del **receptor de LDL** tenían consecuencias menos drásticas que en los explantes de pollo cultivados in vitro en ausencia de **LDL**.

Es por ello importante destacar, que el estudio de la relevancia fisiológica de ciertos receptores por separado, como el **LDLR**, implicado en el transporte de lípidos, es difícil debido a las **funciones redundantes**. Es decir, otros receptores como el del **HDL** o **VLDL** pueden solventar la falta del **LDLR** con actividad **no específica**; internalizando moléculas propias (ligandos) del **LDLR**, acabando por “amortiguar” su ausencia.

Como conclusión final, este artículo aporta nuevas ideas sobre la diferenciación de las células neuroepiteliales en etapas tempranas del desarrollo embrionario, confirmando el papel del FCR-E en la diferenciación neuronal, como estudios previos habían descrito, pero aportando evidencias experimentales del papel crucial que sustenta el **LDL** en este proceso.

6.- Reflexión Final

Es increíble pensar en lo que implica dedicarse a la Biología del Desarrollo. Como hace la Naturaleza para pasar de una secuencia de información biológica, a un individuo multicelular, con estructuras orgánicas complejas? En otras palabras, como a partir de una sola célula, obtenemos un ser formado por miles de tipos celulares? Aquí subyace el Milagro o el Misterio.

La Danza de las Células es el primer nivel de la "opera" que se esta llevando a cabo. La infinidad de moléculas que hay dentro de las células, a su vez, forman parte de la obra sin que apenas percibamos sus movimientos; y mas aún, los fluidos que las rodean, formando parte de la Danza como atrezzo, que contra toda intuición dejan de serlo para actuar con un papel principal.

La formación de las cámaras "secretas" (ventrículos) del cerebro por el fluido que las rellena, tiene un papel más importante que el de las células que formarán el mismo, pues será el fluido (FCR-E) el que con sus moléculas, en una Danza específica y coordinada entre diferentes voces (tipos de apolipoproteínas), determinarán y direccionarán las células para formar las estratificaciones del cerebro y a su vez, el epitelio específico que recubrirá las "paredes" de las cámaras.

Entonces, la Danza de la Células, se basa en la danza de las células implicadas en la misma, mas la danza de las biomoléculas que las conforman, más la danza de los fluidos que rellenan sus cavidades...una danza de danzas, en una suerte de fractal infinito. Como nuestra esfera primordial, en haber empezado sus primeras divisiones mitóticas.

El Misterio último, se nos plantea en la Biología del Desarrollo. La paradoja esta formulada, enfrente de nuestros ojos. Pues, nosotros somos la paradoja:

Somos la misma información (código genético) que codificaba la esfera primordial que un día fuimos, que ahora, intenta comprenderse a sí misma. En resolverla, esta el Desafío.

7.-Entrevista:

La Dra. Carolina Parada, actualmente es investigadora postdoctoral en el Centro de Biología Molecular Craneofacial de la Universidad del Sur de California, en Los Angeles (USA).

Se licenció en Odontología en la Universidad Nacional de Colombia (2000); con Honores. Seguidamente, fue co-investigadora en el Instituto de Genética (2003), de la misma universidad. Realizó el doctorado en Biología (PhD, 2008) en el grupo de desarrollo de vertebrados, en el Departamento de Genética de la Universidad de Barcelona, obteniendo el *CUM LAUDE* (Tesis Excelente) junto con el Premio Extraordinario de Doctorado (2009).

1.- Ismaïl Hermelo (IH): Por que Odontología?

Dra. Carolina Parada (CP): Empecé la carrera de odontología a los 16 años. Durante los años de instituto mi asignatura favorita era biología, pero no quería estudiar biología porque pensaba que debería estudiar algo con aplicación inmediata. En ese momento tenía en mente el futuro, en las dificultades económicas que tenía mi familia y en cómo ser productiva también para ellos. Al final la decisión de adolescente fue buena, finalmente sí que estudié biología pero especializada en el desarrollo craneofacial, que es fascinante.

2.- (IH): Durante la carrera, cual fue la asignatura que más esfuerzo demandaba para ti?

(CP): En odontología teníamos asignaturas puramente técnicas que me parecían en extremo aburridas y que demandaban muchísimo tiempo. Recuerdo noches enteras sin dormir haciendo manualidades. Estéticamente muy interesantes y esenciales para los odontólogos clínicos, pero no para alguien interesado en ciencias básicas. A mi me ayudó a decidirme por la parte biológica de la licenciatura.

3.- (IH): Que factor opinas que era el que faltaba, en esta asignatura?

(CP): Era más una cuestión de gustos que de dificultad de la asignatura.

4.- (IH): Cuál dirías que es la responsabilidad del docente, en este caso?

(CP): Ninguna.

5.- (IH): En el momento de especializar tu carrera hacia una disciplina, lo tenias claro? Tardaste mucho en decidirte? Cuando lo viste claro?

(CP): Afortunadamente en mi universidad, el último año de carrera podíamos escoger una "línea de profundización". Me decidí por una llamada Crecimiento y Desarrollo Craneofacial. Fue un año gratificante y muy productivo. Mi interés por la biología del desarrollo nació ahí.

6.- (IH): Porque el doctorado en Biología? Porque en Biología del Desarrollo y en mas concreto, en Biología Craneofacial?

(CP): Antes de empezar el doctorado, mi formación era principalmente clínica. En los últimos años de licenciatura en Odontología (incluido el año de línea de profundización) tuve que hacer rotaciones en diversos hospitales de Bogotá. Pasé la mayor parte del tiempo en el Hospital Materno-Infantil. Allí tuve la oportunidad de seguir y aprender de un genetista en su trabajo diario con niños con malformaciones congénitas. Las malformaciones craneofaciales, incluyendo el labio y/o paladar hendidos, son muy frecuentes y tienen un costo emocional y

económico altísimo para el paciente y su familia. Ver a estos niños fue impactante y el origen de mi pasión por el desarrollo craneofacial. Después de todos estos años, mis intereses han cambiado y ahora intento responder preguntas más fundamentales en biología del desarrollo, pero usando modelos animales que presentan malformaciones craneofaciales.

7.- (IH): No se habían hecho estudios centrados en la composición concreta del FCR-E. Un artículo tuyo previo, publicado en la revista *Proteomics* (tu artículo más citado a día de hoy), mostro por vez primera un análisis proteómico completo del FCR-E. Identificaste 30 proteínas diferentes. La mayoría de las mismas eran conocidas por tener funciones durante el desarrollo embrionario, a pesar de que la función individual de cada una de ellas nunca fue analizada. Con todo, de estas 30, 14 se hallan en adultos. Y curiosamente, de estas 14, 12 son conocidas por estar cuantitativamente y cualitativamente alteradas en enfermedades neurodegenerativas.

Fue este contexto el que te direccionó a realizar el artículo que se ha explicado divulgativamente?

(CP): Sí, nuestro objetivo en éste y otros proyectos era entender cómo podrían actuar los componentes del FCR-E en diversos aspectos del sistema nervioso central en embriones de pollo. Uno de los criterios que usamos para seleccionar las proteínas que estudiaríamos era su alteración en malformaciones del sistema nervioso o en enfermedades neurodegenerativas. Entre las moléculas identificadas en nuestro estudio de proteómica se encontraban transportadores de lípidos, algunos de los cuales están alterados, en concentración o distribución, en pacientes con Alzheimer y otros desórdenes neurodegenerativos.

8.- (IH): Las premisas en las que se basa, son solidas. Que es lo que te hizo pensar que el papel de los lípidos provenientes del FCR-E eran más importante que los que pudieran llegar por el sistema circulatorio?

(CP): Muchos de los componentes del FCR-E provienen del sistema circulatorio. El transporte de moléculas de la sangre al fluido está controlado estrictamente por la barrera hematoencefálica, que aparece muy pronto durante el desarrollo del embrión, como se demostró en otro estudio realizado en el laboratorio del Profesor David Bueno. Por lo tanto, no creo que se pueda decir que el aspecto local es más importante que el sistémico, porque uno depende del otro. Nuestro objetivo, en todo caso, era estudiar el microambiente al cual se encuentran expuestos los progenitores neuroepiteliales.

9.- (IH): Se analizó la composición de lípidos e lipoproteínas en el FCR-E, para compararlo entre otros con el plasma del adulto. Las diferencias observadas, ya apuntan que clase (o clases) de apolipoproteína pueden estar jugando un papel regulador (Tabla 1)). Los resultados fueron los esperados. Como determináis, por ejemplo, que valores que salen fuera del “rango esperado “ de HDL para FCR de embrión, no son fruto de la variabilidad entre individuos?

(CP): El volumen de FCR-E que se obtiene de cada embrión es muy pequeño, lo cual nos obligaba siempre a hacer pools de fluido para cada experimento. El número de embriones utilizado, bastante alto, nos permitía saber que los resultados eran estadísticamente significativos y que las diferencias encontradas entre las condiciones analizadas no eran producto de variabilidad inter-individuos o del experimento, ya que cada uno de ellos se repitió tres veces.

10.- (IH): En la Tabla 2), observamos que hay un pico en el estadio HH27 de moléculas lipídicas (Colesterol, Triglicéridos y Fosfolípidos) que coincidiendo con el periodo de máxima diferenciación de las progenitoras de las células neuroepiteliales. En este experimento, ya se podía afirmar que se estaban corroborando las premisas? O aún podría ser ello una consecuencia del período de máxima proliferación?

(CP): Nuestros resultados indican que los lípidos del FCR-E contribuyen significativamente tanto con procesos de proliferación como diferenciación de los progenitores neuroepiteliales. La idea de que los lípidos contribuyen con diferenciación neuronal no es nueva. Hay ratones con mutaciones en transportadores de lípidos que presentan alteraciones en el desarrollo del sistema nervioso central. El pico que mencionas no parece ser al azar y sugiere que los lípidos del FCR-E podrían tener una función en diferenciación neuronal. Sin embargo, los resultados obtenidos con los cultivos no nos permiten descartar que la disminución en diferenciación neuronal cuando no hay lípidos en el medio se deba a que la proliferación está alterada, y el pool de progenitores reducido. El modelo de ratón tampoco nos permitió ser concluyentes en ese sentido.

11.- (IH): Porque la variación del contenido del FCR-E sugiere una implicación funcional del mismo sobre las células progenitoras del neuroepitelio, y no es una consecuencia del mismo desarrollo? No podía ser ello una consecuencia de la máxima actividad del neuroepitelio y/o el inicio de la diferenciación neuronal?

(CP): Ambas opciones son posibles. En el pasado, el FCR-E se consideraba como un depósito de células muertas, de moléculas que deberían ser desechadas y/o producto de procesos metabólicos. Sin embargo, nuestro trabajo y el de otros grupos ha demostrado la importancia de proteínas y lípidos provenientes del FCR-E en el control del destino celular de los progenitores neuroepiteliales así como en el establecimiento del patrón del sistema nervioso central. También se ha demostrado, mediante el uso de modelos animales, que el FCR está implicado en el control de la neurogénesis en adultos (*paper* publicado en *Science* en 2006). La mayoría de resultados en estadios embrionarios provienen de estudios *in vitro*. Es esencial el uso de modelos animales para confirmar nuestras observaciones.

12.- (IH): A nivel experimental , que era más complicado para ti, la obtención del FCR-E o la obtención de explantes de neuroepitelio suficientemente homogéneos?

(CP): El uso de embriones como modelo nos facilitaba la ejecución de los experimentos, por la gran disponibilidad de muestras. Ambos procedimientos, extracción de FCR-E y cultivo de neuroepitelio, eran relativamente fáciles. En la obtención del fluido siempre debíamos tener cuidado de no contaminarlo con células o con sangre porque eso podría modificar los resultados, especialmente en el análisis del contenido proteico. Los cultivos no eran perfectamente homogéneos pero lo suficiente como para usarlos para probar nuestras hipótesis, obteniendo resultados fiables y replicables.

13.- (IH): En la Figura 3 A) se observa claramente que el LDF es quien promueve la supervivencia neuronal. Me parece significativo que una sola fracción este implicada en la supervivencia, así se garantizan efectos solapados. Se puede considerar que el hecho de que solo el LDF obtuviera los valores del Control, como un tipo de mecanismo de seguridad?

(CP): En el LDF está todo el contenido proteico del FCR-E, a excepción de los transportadores de lípidos, por lo cual no es sorprendente que controle funciones tan importantes como la supervivencia. En otro estudio, nuestro grupo demostró, usando métodos *in vitro* e *in vivo*, que

el FGF2 del fluido promueve la proliferación de los progenitores neuroepiteliales. Seguramente que hay más factores de crecimiento involucrados en la regulación de este proceso que no pudimos identificar con las técnicas disponibles en ese tiempo.

14.- (IH) Te parece plausible, que el efecto del LDL “a solas” sobre el neuroepitelio, no se vea completo por el modelo del explante *in vitro*? Es decir, el LDL solo (Figura 3 A), induce diferenciación y proliferación, pero también muerte. Puede ser, que sea debido al hecho de que le falta el mesénquima al explante?

Argumento basado en que LDL+LDF (Figura 3 B) muestra diferenciación, supervivencia, pero no proliferación.

(CP): Como mencioné antes, nuestros estudios *in vitro* han generado una gran cantidad de información que debe ser corroborada con el uso de modelos animales. Con los cultivos estamos ignorando las funciones de todas las estructuras y tejidos circundantes, que desafortunadamente no se pueden incluir en el explante, por limitaciones técnicas. Con respecto a tu pregunta específica, no se incluyó mesénquima en ninguno de los experimentos que se presentan en las figuras 3A y 3B, incluyendo el explante control expuesto al FCR-E completo. Aunque no incluimos otros tejidos, las funciones celulares en los explantes cultivados con FCR-E son comparables a la situación *in vivo*. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que en presencia de otras proteínas, la LDL estaría induciendo diferenciación de los progenitores e inhibiendo proliferación. La pregunta sería cómo interactúa la LDL con otras proteínas del fluido para controlar los diferentes procesos celulares analizados.

15.- (IH): El papel del receptor del LDL (a parte del VLDLR) se ha analizado. Si lo transportado por las LDL no se internaliza en el neuroepitelio, no serviría de nada la presencia de lípidos varios en el FCR-E. Con todo, una duda surge del razonamiento.

Porque no es lo mismo, analizar la falta de una apolipoproteína, que el defecto en un receptor?

Si la apoproteína no esta, aunque este presente el receptor, no habrá entrega de lípidos. En cambio, sabemos que existe unión inespecífica en los ligandos de los receptores (sobre todo en mamíferos), o redundancia. En otras palabras, quien acaba determinando la entrada de lípidos, son los receptores.

(CP): Es verdad, pero la redundancia funcional se aplica tanto a ligandos como a receptores. En otros sistemas, por ejemplo en la región craneoafacial, mutaciones en *Bmpr1a* son compensadas por el *Bmpr1b*. Es probable que pase lo mismo en el caso de receptores para lipoproteínas y otros transportadores de lípidos.

16.- Los resultados en ratones mutados, aún y ser no significativos, están en concordancia con los obtenidos en pollos. Los ratones deficitarios en receptor de LDL, tienen menos diferenciación que los normales. Lo mismo para la supervivencia, los ratones mutados tienen más células Caspasa-3 activa positivas (mueren mas). Crees que aún y la redundancia de ligandos, con muchas mas replicas se habrían obtenido datos concluyentes también en mamíferos?

(CP): No creo, el número de embriones incluido en los análisis era estadísticamente significativo. Es frecuente que no haya fenotipos severos *in vivo* por compensación. Para comprobarlo se deberían generar dobles mutantes.

17.- A nivel de investigación en general, cuál es tu opinión sobre realizar parte de tu carrera científica en el extranjero?

(CP): Hablando desde mi experiencia personal, para mi fue particularmente importante mudarme a otro país porque nací en un sitio con pobres recursos económicos para investigación. En Colombia es muy complicado realizar experimentos complejos, no por falta de personas capacitadas o de interés, pero por dificultades financieras y burocracia extrema. En Catalunya tuve mi primer acercamiento real a la biología del desarrollo y obtuve algunos resultados interesantes. Pero creo que ha sido en Estados Unidos donde me he sentido mejor como investigadora. Trabajar con gente proveniente de diferentes países, con estilos de investigación diferentes y distinto *backgrounds* realmente ayuda a tener una visión más amplia de los problemas de investigación y a construir tu “personalidad” como científico. No creo que eso se pueda lograr quedándose en el mismo grupo, en la misma ciudad o en el mismo país. De la misma manera, la experiencia fuera del laboratorio ha sido muy interesante y enriquecedora, tanto en Barcelona como en Los Angeles.

18.-Cual consideras que es la diferencia mas grande entre tu experiencia en los Estados Unidos y tus años de doctorado en nuestra Facultad?

(CP): Una respuesta parecida a la anterior. Los recursos económicos son la principal diferencia entre Catalunya y Estados Unidos. También soy más madura ahora y puedo aprovechar mejor lo que se ofrece aquí. Para cualquier científico es muy gratificante poder planear experimentos y llevarlos a cabo sin restricciones de ningún tipo, así como tener tecnología de punta al alcance de la mano. Esto realmente permite probar diferentes hipótesis y considerar todos los aspectos que influyen en un proceso en particular . Al final, tener recursos elimina una gran parte del estrés y hace posible disfrutar del trabajo diario.

19.- Que piensas que debería mejorarse en la investigación científica en Catalunya?

(CP): El potencial de Catalunya es impresionante y así lo mostró antes de la crisis económica, cuando se construyeron nuevos centros de investigación y se incrementó el número de publicaciones en *high impact factor journals*. Con eso está todo dicho.

20.- Algún consejo que te pudieras dar a un “yo” tuyo del pasado, que te hubiera gustado escuchar?

(CP): Un consejo general sería preocuparme menos por el futuro, al final ha ido mejor de lo pensado. Tal vez habría podido estudiar biología desde un principio...

21.-Y del pasado, al futuro. Has pensado alguna vez en dar el salto hacia la empresa privada, o tienes pensado seguir con la carrera científica?

(CP): No me interesa la empresa privada, no hay espacio para hacer preguntas fundamentales en biología. Realmente no tengo un gran conocimiento de cómo funciona pero el hecho de que generar dinero sea una prioridad, le da un toque negativo. Continuaré en academia hasta cuando sea posible.

Muchas gracias Dra. Carolina.

8.-Bibliografía:

Bibliografía:

- 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.-Agradecimientos:

Agradecemos al Dr. David Bueno, por sus sugerencias e tiempo y a la Dra. Carolina Parada por participar en la entrevista.