

Transferencia de ARNs y ribosomas desde las glías a los axones

José Roberto Sotelo^{1*}

Resumen

Ha sido discutido durante muchas décadas si los axones contienen ARNs y ribosomas. En los últimos años se ha aceptado que ambos provienen del soma neuronal. Sin embargo, se ha abierto una nueva frontera de trabajo considerando un posible origen alternativo adicional de esos elementos: la glía adyacente al axón. En esta revisión nos dedicamos a enumerar las distintas pruebas que se han acumulado sobre la transferencia glía-axon de ARNs y ribosomas. Describimos estos procesos en axones de invertebrados y de vertebrados. Discutiremos sobre las interesantes implicancias que tiene el intercambio de ARNm (ARN mensajeros), los micros ARN (pequeños ARN o ARNm_i, reguladores) y los ribosomas desde la glía al axón, respecto a la integración funcional entre las glías y los axones. Aunque es necesario todavía un mayor apoyo experimental para fundamentar este concepto, que se encuentra en evolución creciente y reciente, el mismo impacta fuertemente sobre nuestro entendimiento de la biología molecular y celular de los axones tanto desde el punto de vista funcional como patológico. Posiblemente la fisiopatología de muchas enfermedades de los axones humanos, debe ser revisada exhaustivamente en relación a la posible participación de la transferencia de ribosomas y ARNs desde la glía al axón así como el efecto regulador de la glía sobre la síntesis proteica axonal. Estos nuevos elementos podrían aumentar las posibilidades de introducir intervenciones terapéuticas controladas durante la neurodegeneración o la injuria axonal.

Palabras clave

Axón, regeneración axonal, célula de Schwann, transferencia de ARN de célula a célula.

Title

Transfer of ARNs and ribosomas from glias to axons.

Abstract

Whether axons contain RNAs and ribosomes has been motive of discussion along decades. Nowadays, it is accepted that the neuronal soma provides axons with both mRNAs (messenger RNAs) and ribosomes, by axoplasmic transport. Nevertheless, without denying neuron soma origin, an alternative origin has been proposed: the adaxonal glia. This review describes new evidence supporting glia-to-axon ribosomes and RNAs transfer and describes these processes in invertebrate as well as in vertebrate axons. The important implications of the transfer of messenger RNAs, micro RNAs and ribosomes from glia to axon are discussed, especially in relation to the functional integration between

1. Departamento de Proteínas y Ácidos Nucleicos. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE). Montevideo, Uruguay.

* Contacto: José Roberto Sotelo. E-mail: sotelotalibo@gmail.com Dirección postal: IIBCE, Av. Italia 3318, C.P. 11600 Montevideo, Uruguay.

glias and axons. Although more experimental support is needed to fundament this concept, which is recently evolving continuously, it strongly impacts on our understanding of the molecular and cellular biology of axons regarding function and pathology. It is possible that the physiopathology of many human axonal diseases should be deeply reviewed under the light of glia to axon RNA and ribosome transfer demonstration, as well as the regulatory role of glia over axonal protein synthesis. A better understanding of the above mentioned elements might help to pave the way for the introduction of controlled therapeutic measures during progressive neurodegeneration or axonal injury.

Key Words

Axon, axon regeneration, Schwann cell, cell to cell RNA transfer.

Introducción

La década del 40 del siglo XX mostró la persistente dificultad de detectar ribosomas en los axones por medio del microscopio electrónico. La dificultad no se debía sólo al instrumento, sino a características particulares de la distribución celular de los ribosomas y su estrecha asociación con el cito-esqueleto y quizás otros factores que no habían sido considerados, fundamentalmente por desconocimiento.

Para explicar el crecimiento axonal, Weiss & Hiscoe en 1948 [1] postularon el mecanismo de transporte axoplásmico lento (0,5-5 mm por día) como responsable del crecimiento y regeneración. Aunque este modelo actualmente es considerado poco realista, esta propuesta permitió descubrir otros aspectos sobresalientes de la biología de los axones, como el transporte axoplásmico rápido (ver revisión de Brady et al. [2]). El descubrimiento del transporte axoplásmico en la década del 70 [3], abrió las puertas al descubrimiento de los motores moleculares y el papel del citoesqueleto como soporte (rieles o vías como sinónimos) del movimiento molecular celular, e innumerables otras consecuencias.

Mientras tanto la ausencia de los ribosomas (ya identificados en ese momento como elementos indispensables para la generación de la síntesis proteica), desvió la atención hacia el transporte de proteínas sintetizadas en el soma neuronal como remplazo de las proteínas axonales estructurales que, por consecuencias termodinámicas,

se degradan a diferentes tiempos. Los avances rápidos de las metodologías que permitieron el descubrimiento del transporte axonal rápido, dejaron claro que este no transportaba proteínas estructurales. Esto produjo una hiper-valoración de la propuesta del transporte lento (0.5 – 5 mm /día), como responsable del transporte de las proteínas estructurales axonales [1]. Esta hiper-valoración del transporte axonal lento generó a su vez una corriente opuesta pero consistente que buscaba pruebas bioquímicas de la existencia de ribosomas y ARNs en los axones. Un problema que, en esa época, se consideró prácticamente insalvable fue la dificultad de disecar el axón de las vainas mielínicas y las células de Schwann que los rodean. Cualquier ARN que se encontraba en los axones era considerado contaminación mielínica.

A) Transporte axoplásmico de ARNms hacia los axones

Un pequeño grupo de investigadores se dedicó al análisis del contenido de ARN del axoplasma [4-27]. Una serie de hallazgos recientes han contribuido a apoyar la hipótesis de la síntesis proteica axonal (por revisiones ver [28-34]).

El transporte de ARN desde el soma neuronal a los axones ha sido demostrado utilizando distintas metodologías y distintos modelos experimentales, tales como cultivos neuronales disociados en cámaras compartimentadas con

microflujo [10], así como en las terminales axonales donde se mostró el mRNA de la β -catenina en los botones germinales recién formados, donde es traducido para regular la dinámica de la liberación de vesículas sinápticas [35, 36]. Los ARNm han sido encontrados tanto en neuronas embrionarias como en neuronas disociadas adultas de los ganglios raquídeos en cámaras compartimentadas con circulación de microfluidos. Fueron detectados ARNm que codifican para la β -actina y para otras proteínas involucradas en los procesos dinámicos de la actina [10, 25-27]. También se detectaron las secuencias involucradas en determinar el destino de síntesis (axonal, pre-sináptico) de algunos ARNm. Por ejemplo, se demostró que la presencia del extremo 3'UTR de la β -Actina es suficiente para causar la localización final del ARNm en los extremos terminales de los axones del ciático de ratón. Si se elimina ese segmento del 3'UTR, ese efecto de localización se pierde [5, 37, 38]. Por el contrario, la presencia del extremo 3'UTR de la γ -actina no tuvo el mismo efecto cuando se insertó en el mensajero de la β -actina [24].

La injuria del nervio (sección o aplastamiento) incrementó la acumulación en los axones del ARNm de GFP que había sido fusionado al extremo 3'-UTR de la β -actina [24]. En los axones adultos son traducidos los ARNm de factores de transcripción que son transportados de forma retrograda hacia el soma neuronal, aparentemente para transmitir información relacionada con la injuria axonal [39].

En los axones están presentes todos los componentes necesarios para que se produzca la síntesis proteica en forma regulada a nivel celular (ARNm, ribosomas, ARNt, micro-ARNs, así como todas las enzimas y factores asociados). Por otra parte, si comparamos la distancia del soma a los axones, con la estrecha cercanía entre la célula de Schwann o los oligodendrocitos con los axones, es seductor plantear la hipótesis de que estas glías les proporcionen ribosomas y ARNm. Esto último se acentúa si recordamos que ambas

células tienen el mismo origen embrionario. Lo mismo se puede decir con respecto a los otros factores traduccionales necesarios para la síntesis proteica. Trataremos exhaustivamente este tema más adelante, ya que publicaciones recientes han aportado información suficiente para apoyar esta hipótesis.

La dificultad de disecar bioquímicamente la célula de Schwann del axón, ha estimulado la búsqueda de otros tipos celulares como las neuronas que generan axones gigantes, tales como el axón de Mauthner (100 μ m de diámetro, en los peces óseos) o el axón gigante de invertebrados como el calamar (diámetro promedio 300 μ m, pudiendo llegar a 1000 μ m, o sea 1 mm) en los cuales esto podría ser más factible. Algunos ingeniosos sistemas de micro-disección de axones en conejos y ratas -desarrollados por Edward Koenig-, demostraron la síntesis proteica axonal de algunas proteínas consideradas como componentes del transporte axonal lento. Posteriormente, Koenig y colaboradores descubrieron nuevas estructuras axonales a las que llamaron (en inglés) *Peri-Axoplasmic-Ribosomal-Plaques* (PARP) [14, 20, 32, 34] que, como su nombre lo indica, contienen ribosomas. Las PARPs contienen una red de actina, en cuyo entramado hay ribosomas y ARNms, incluyendo el que codifica para la beta-actina [34]. También se detectó el que codifica para la miosina Va [7]. Las PARPs contienen también proteínas de unión al ARN, como ZBP-1 [40] y HUD [7]. También contienen proteínas como los motores moleculares miosina Va y la kinesina, pero no el motor retrogrado llamado dineína [20].

La proteína ZBP-1 interactúa (como otras RBP, del inglés: RNA Binding Proteins) con el extremo 3' o 5' de las UTR (secuencias no traducibles, del inglés: untranslated regions) del ARNm [41, 42] y con proteínas adaptadoras (que dependiendo del ARNm considerado pueden ser más de una), hasta que una de ellas se une a un motor molecular, el cual finalmente conduce al ARNm al sitio blanco en el cual será traducido, pero también pueden regular la traducción [10, 25-27, 43].

Este mecanismo parece ser universal desde el punto de vista celular, porque en fibroblastos sucede lo mismo con el ARNm de la beta-actina que es conducido a los lamelipodios de dicha célula donde va a ser traducido [37]. Generalmente, cuando los ARNm están empaquetados con estas proteínas específicas, llegan a su sitio blanco (sitio de destino final) donde son desempaquetados y traducidos, pero la traducción de los mismos se encuentra inhibida durante el recorrido del viaje. Suponemos que estas RBP cumplen las mismas funciones en los axones [34].

La asociación de ZBP-1 con las PARPs genera algunas preguntas adicionales: Estos sitios (PARPs) ¿son lugares de almacenamiento de ARNms? ¿Estos ARNms se traducirán en la PARPs? ¿De dónde provienen estos ARNms? ¿Son transcritos provenientes del soma neuronal o de las células de Schwann y enviados luego a los axones?

El transporte de ribosomas y ARNms provenientes del soma neuronal y transportados a los axones ha sido demostrados fundamentalmente en neuronas en cultivo [9]. Sin embargo, a pesar de los experimentos realizados que demuestran la transferencia de ARNms gliales a los axones gigantes de invertebrados [44] este fenómeno no ha podido ser demostrado completamente, sino parcialmente en los axones de mamíferos. Por ejemplo, se detectó que el ARNm de la subunidad menor de los neurofilamentos se transfiere desde la célula de Schwann al axón [45].

B) Ribosomas en los axones

Muy pocas publicaciones antes de la década del 90 describen ribosomas en los axones. Las más antiguas son de la década del 70, por ejemplo J. Zelena [46, 48], quien los encontró cerca de los ganglios de la raíz dorsal (en ratas) y cerca de los nodos de Ranvier en el nervio ciático. El origen en la célula de Schwann de los ribosomas axonales fue propuesto por Li et al. [49, 50], usando Microscopía Electrónica de Transmisión (MET). Estos autores encontraron vesículas (rodeadas

por doblesmembranas) en forma de dedo protruyendo dentro de los axones desde la célula glial. Para resolver el problema de que sus imágenes son estáticas y que pretenden describir un fenómeno dinámico, realizaron secciones seriadas con micrótopo siguiendo los dedos que protruyen en los axones encontrados a lo largo de cientos de micro-secciones seriadas. Interpretaron sus observaciones como evidencia de la transferencia de ribosomas de célula a célula. Lo curioso de su trabajo es que ese análisis se realizó en axones de la médula espinal (axones del Sistema Nervioso Central, SNC). Aunque no los describen con ese nombre se ha llegado a la conclusión de que eran los axones sensitivos a los que en español llamamos haces de Goll y Burdach. Por otra parte, ellos encontraron esos dedos que sugieren transfieren ribosomas a los axones, muy cerca del cono de arranque de los axones. Esto parece una contradicción con la idea de que es en los axones largos en donde la transferencia glía-axon es necesaria, ya que la distancia hacia el soma es tan larga que la demora de los ribosomas y los otros ARNs en recorrer esa distancia generaría una patología por carencia de la maquinaria de síntesis proteica. Sin embargo, en el comienzo de estos axones largos centrales, a corta distancia del soma, también parecen transferirse ribosomas al axón. Esto nos hace pensar en un mecanismo evolutivo más general de colaboración y de asociación metabólica entre la glía y los axones.

Otro análisis por MET asociado con inmunocitoquímica, pero en este caso en el nervio ciático de la rata (nervio del Sistema Nervioso Periférico, SNP), utilizando un anticuerpo anti-ribosomas de mamífero [16], mostró ribosomas decorados con el anticuerpo específico en el interior de vesículas originadas en la célula de Schwann, protruyendo al interior de los axones, por caminos similares a las incisuras de Schmidt-Lanterman. Este artículo muestra ribosomas axonales individuales o acumulados en estructuras similares a Ribo-Núcleo-Partículas (RNPs) o *clusters*, en la zona central del axón, “hipotéticamente”

asociadas a la zona rica en microtúbulos (decimos “hipotéticamente” debido a que es un estudio estático, sin detección bioquímica de los microtúbulos). También se encontraron acumulaciones tipo RNPs en la zona cortical axonal que pueden corresponder a Placas Peri Axoplásmicas Ribosomales (PARPs del inglés), por su forma, su localización y la cantidad de ribosomas. Los ribosomas se detectaron también por hibridación in situ con una sonda contra ARN ribosómico por medio de Microscopía Fotónica (MF) [16].

C) Transferencia de ARNm y ribosomas desde la célula adaxonal (glía) al axón

De aquí en más nos dedicaremos a describir las publicaciones que han mostrado experimentalmente la realidad de esta hipótesis. La transferencia de ribosomas desde la célula de Schwann al axón ha sido documentada fehacientemente [51, 52]. Sin embargo, aunque se han cosechado pruebas de la transferencia de ARNms, como el ARN que codifica para la subunidad menor de los neurofilamentos por Hibridación In Situ (HIS), de la célula de Schwann al axón [45] aún queda por definir de una forma general este tipo de transferencia.

A pesar de algunas observaciones muy interesantes de Singer y Green [53] quienes inyectaron intraperitonealmente precursores radioactivos de ARN en salamandras a las que previamente habían seccionado los nervios periféricos de las piernas y luego de eso por radioautografía, encontraron marcación axonal (en el cabo distal, separado del soma neuronal). Pasó mucho tiempo antes que la evidencia de transferencia de ARN de la glía al axón fuera confirmada en mamíferos.

La transferencia célula a célula de ARN, también se confirmó en cultivos de células PC12 conectadas por nanotúbulos [54], entre células foliculares y ovocitos [55] y entre mastocitos humanos y mastocitos de ratón [56]. Existen otros casos de transferencia intercelular de organelos, mejor entendidos y aceptados, que incluyen

melanosomas desde melanocitos a keratinocitos [57] y mitocondrias en una línea celular epitelial de pulmón, también en plantas y drosophilas [58].

C.1 Invertebrados

Harold Gainer y Raymond Lasek [59], postularon que la glía que envuelve el axón gigante de calamar transfiere proteínas neosintetizadas al axón gigante, revisión 2016 [60]. Ellos extruyeron el axoplasma, liberándolo de la glía por un sistema desarrollado por Tasaki I. [21], aplastando suavemente el axón gigante por medio de un rodillo de plástico haciendo que el axoplasma saliera por un extremo como la pasta de diente de un tubo dentífrico. La vaina glial vacía de axoplasma fue marcada con [3H]-leucina. El tubo glial vacío fue perfundido por solución salina que al salir contenía proteínas marcadas con [3H]-leucina. A estos experimentos ellos le agregaron el concepto de que el axoplasma gigante no contiene la maquinaria de síntesis proteica total y que sólo contiene ARNt [3, 61, 62].

Por su parte, el grupo de Antonio Giuditta usando la misma metodología, pero ofreciendo [3H]-uridina en lugar de [3H]-leucina a la vaina vacía de la glía, recuperaron [3H]-ARNs neosintetizados en el medio de perfusión [11, 63-65]. Giuditta et al. registraron una biblioteca de más de 100 ARNms y también demostraron en los terminales sinápticos la síntesis de proteínas sensibles a la cycloheximida (antibiótico que inhibe la síntesis proteica ribosomal eucariótica). Demostraron también la presencia de ribosomas y poliribosomas en las grandes terminales sinápticas (calamar), en lugares que contienen señales de alta concentración de fósforo por *Electron Microscopy Imaging* (ESI) [65].

C.2 Transferencia de ARN hacia los axones de vertebrados

Como ya mencionamos anteriormente, la primera evidencia de transferencia de ARN desde la célula de Schwann al axón de vertebrados fue desarrollada por Singer y Green [53] basada en autoradiografía de los cabos distales de los nervios ciáticos seccionados de salamandra antes de

de la inyección intraperitoneal de 3H-uridina. La marcación autoradiográfica del nervio en el cabo distal, mostró un gradiente decreciente de la célula de Schwann al axón, demostrando que esos ARN habían sido sintetizados en el núcleo de la glía y luego transferidos al axoplasma. Tiempo después Gambetti et al. [66], realizando autoradiografía de nervio óptico marcado con [3H]-uridina (por inyección intraocular) obtuvo resultados similares. La transferencia de ARN desde la célula de Schwann a los axones de vertebrado fue demostrada autoradiográficamente en nervio ciático lesionado de rata [6]. Ambos nervios ciáticos del mismo animal fueron seccionados a

4.5 cm. del ganglio raquídeo. Una cámara construida con un tubo de plástico cortado en media caña se colocó alrededor del cabo proximal y se selló en ambos extremos con grasa de silicona. El recipiente construido alrededor del cabo proximal del ciático derecho se llenó con una solución Ringer a la que se agregó uridina tritiada durante 30 minutos (ver figura 1). El recipiente que rodeaba el cabo proximal del nervio izquierdo se llenó sólo con solución Ringer sin radioisótopos (para ser utilizado como control). La marcación fue detectada sobre la célula de Schwann, la mielina y el axoplasma. Es importante señalar que este experimento descarta absolutamente que la

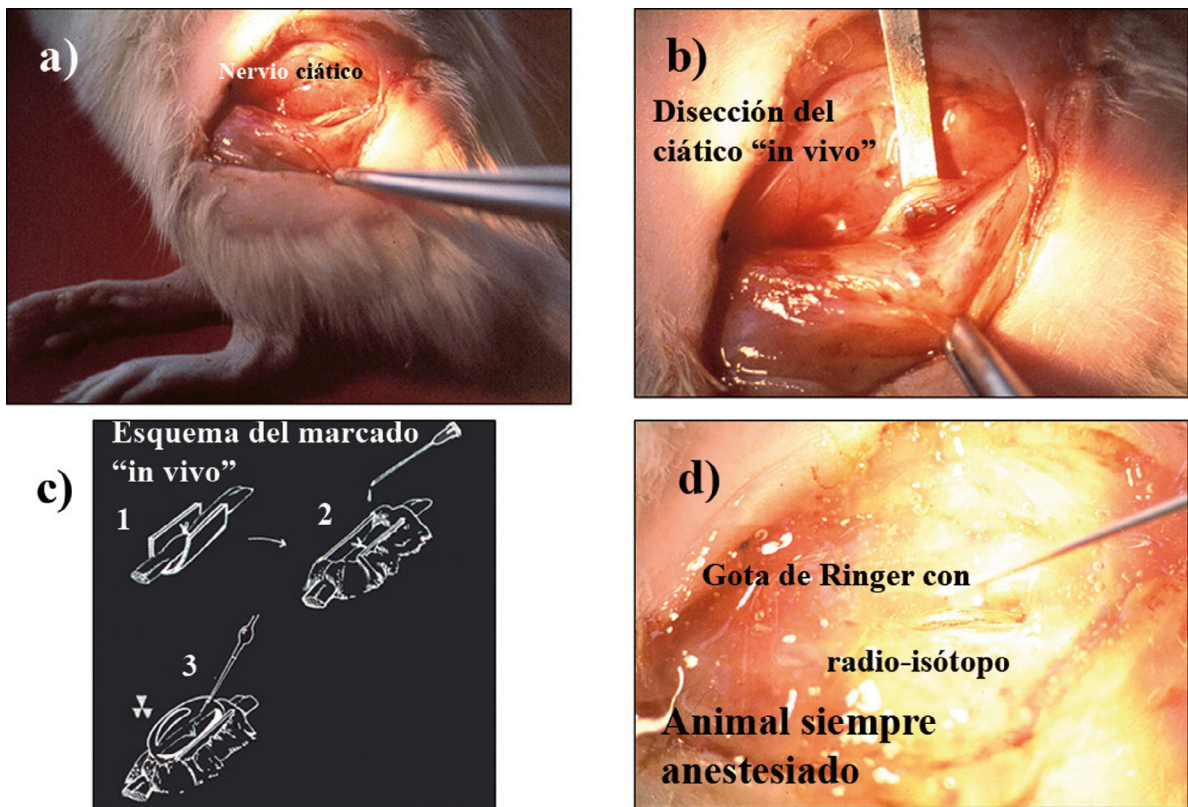


Figura 1. a) La fotografía representa a una rata de nuestra colonia institucional anestesiada y con suministro de analgésicos a la que se le ha disecado la pierna derecha a mitad del muslo y se expuso el nervio ciático (en esa región no hay arterias ni venas que durante la disección puedan sangrar) y se liberó el nervio ciático de las estructuras que lo rodean, como se puede ver en la imagen b). En el esquema c) se muestra como se diseñó el recipiente alrededor del cabo proximal luego de haber sido seccionado o realizado axotomesis (ambos procedimientos garantizan la interrupción completa de los axones). En los animales que se estudiaría posteriormente la regeneración de los axones, se prefirió realizar la axotomesis porque permite más fácilmente la regeneración. d) Fotografía del recipiente sellado y lleno con la solución Ringer a la que se le adicionan los aminoácidos tritiados o la uridina tritiada (precursores radioactivos); se puede observar la aguja y la gota de Ringer en la punta.

marca provenga de la transcripción en el soma neuronal y sea transportada al cabo proximal (por transporte axoplásmico), porque el tiempo de marcación fue de sólo 30 minutos. A las velocidades registradas del transporte axoplásmico rápido se hubieran necesitado 2.5 horas para recorrer los 4.5 cm. desde el ganglio raquídeo a ambos cabos proximales (derecho e izquierdo). El cabo proximal del nervio control (nervio izquierdo contralateral), no tenía ninguna marcación. Más aún, el segmento inmediatamente por encima de la zona marcada con radioisótopos del ciático derecho, estaba vacío de marcación. Los autores concluyeron que la uridina tritiada fue incorporada a la célula de Schwann y transcripta a ARN a ese nivel y luego transferida al axón. Con la metodología utilizada no se podía identificar qué tipos de ARN habían sido sintetizados.

C.2.1 El uso de ratones mutantes con degeneración Walleriana lenta (Wlds) como modelo para demostrar la transferencia de ARN desde la célula de Schwann al axón

La degeneración Walleriana lenta (Wlds) es una mutación autosómica dominante en la cual un re-arreglo del cromosoma 4 produjo una proteína de fusión. La función de esta proteína mutante de fusión es desconocida, pero produce un enlentecimiento en la degeneración Walleriana por tres semanas [67, 69]. Estudios recientes sugieren que la proteína de fusión protege a los axones por un mecanismo que aún es pobremente entendido [70-71]

Van Minnen y colaboradores [51, 52, 72] usaron la porción distal (axones desmatizados) de los nervios ciáticos seccionados de los ratones Wlds para probar la transferencia trans-celular de ribosomas de la célula de Schwann al axón.

La proteína ribosomal L4 fue marcada con eGFP y se expresó exclusivamente en las células de Schwann del cabo distal mediante lentivirus (LV). A posteriori esta proteína fue detectada en los axones [51]. Más aún, la señal de GFP colocalizó con la señal de ribosomas detectados por inmunocitoquímica [73]. A causa de que los

axones distales no pueden obtener ribosomas del soma, y el axón no puede sintetizar ARNs, el incremento axonal de ribosomas solo puede deberse a la transferencia desde la célula de Schwann. Consistente con este hallazgo, por inmunocitoquímica se observaron protrusiones marcadas desde la célula de Schwann hacia el axón en internodos y paranodos.

C.2.2 La célula de Schwann transfiere ribosomas a los axones normales o a los axones regenerantes

En el año 2011 Court et al. [52] usando la misma estrategia de expresión (L4-eGFP) estudiaron axones en regeneración en el mismo modelo de animal. Se desarrollaron dos experimentos básicos. Primero, cultivos de células de Schwann cargadas con el LV-L4-eGFP fueron inyectadas en el cabo distal del nervio ciático aplastado en cual ya no existían células de Schwann nativas. En este caso los axones que recibieron las células de Schwann con el transcripto, recibieron ribosomas marcados.

Los injertos que recibieron las células de Schwann transfectadas con LV-L4-eGFP, se recolocaron quirúrgicamente haciendo de puente entre el cabo proximal y el cabo distal. Las células de Schwann del injerto envolvieron los axones que crecían a través del mismo hacia el cabo distal y posteriormente los axones recibieron ribosomas marcados con L4-eGFP.

Estos experimentos sugieren la posibilidad factible de utilizar sistemas similares para reparar patologías axonales por carencia de ARNs específicos, o incluso en patologías de la célula de Schwann.

C.2.3 Durante la demielinación aumenta la transferencia de ribosomas y polisomas desde la célula de Schwann al axón

Esto fue demostrado en ratones a los que se había inducido la incorporación transgénica de células de Schwann transformadas para sintetizar proteínas ribosomales fluorescentes incorporados a modelos animales que desarrollaban

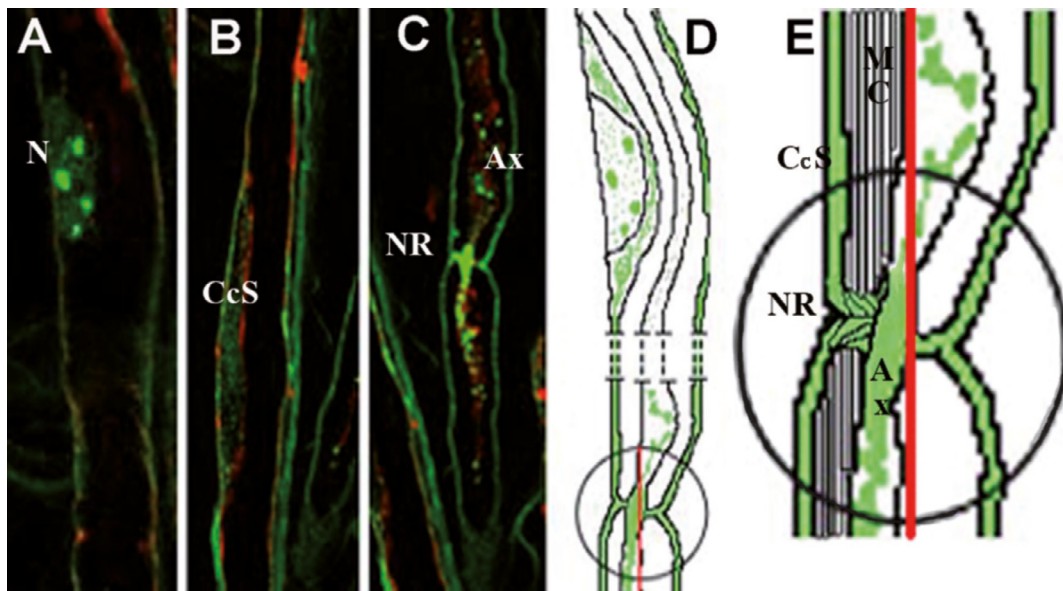


Figura 2. Se puede observar el plano confocal de una fibra miélnica aislada, en la cual se realizó inmunocitoquímica con el anticuerpo anti-BrU (se une al ARN neosintetizado, aquí por convención se la puede ver en verde). A) La misma fibra a la altura del plano confocal que contiene el Nucleo (N) de la célula de Schwann. El núcleo tiene mucho ARN marcado, pero el mayor marcado se ve en los 4 nucléolos. En este plano no se ve el axoplasma de esta fibra miélnica. B) Otro plano confocal en el que se observa una parte del citoplasma externo de la célula de Schwann, donde se observa el ARN-BrU que se ha originado en el núcleo y ha sido transportado al citoplasma de la célula de Schwann. C) Otro plano confocal de la misma fibra miélnica en la que se observa el axoplasma. El axoplasma está registrado a la altura del nodo de Ranvier (NR). La máxima marcación se registra a nivel del NR y va disminuyendo en forma exponencial a cada lado del NR, es importante el aspecto granuloso del marcado del ARN-BrU que claramente indica que no es marcado inespecífico. (Imagen original no publicada hasta ahora). D y E) Dibujo esquemático de la fibra registrada en las imágenes A, B, y C. La mielina compacta (MC) se esquematiza como líneas paralelas (membranas adheridas sin citoplasma entre ellas que en las imágenes A, B y C, corresponden a zonas negras, lo cual demuestra que la mielina compacta no tiene ARN-BrU. CcS (Citoplasma de la célula de Schwann); NR (Nodo de Ranvier); Ax (Axoplasma), en verde ARN-BrU. La línea roja separa el esquema en dos partes; a la izquierda, se ve un esquema que incluye la mielina compacta; a la derecha se representa el esquema de como se ha movido el ARN-BrU desde el nodo de Ranvier hacia las otras partes del axón. El círculo en D señala el círculo que se representa en E.

demielinización autoinmune inducida experimentalmente en axones periféricos o en axones de cerebros humanos obtenidos de autopsia a posteriori de una esclerosis múltiple. La cuantificación de la cantidad de ribosomas en axones mostró que los axones que tenían demielinización tenían más cantidad de ribosomas que los controles [73].

C.2.4 La transferencia de ARN de la célula de Schwann al axón es dependiente de la Miosina Va

Ha sido publicado recientemente [45] la demostración que la célula de Schwann de los

ciáticos de mamífero (rata y ratón) transfieren ARNs neo-sintetizados hacia los axones sanos y los axones en regeneración que ellas envuelven. Marcamos con bromo-uridina segmentos de ciático separados de su origen (nervios sanos o seccionados 18 horas antes) y los ARNs así marcados los identificamos con un anticuerpo específico anti-Bromo-Uridina (anti-BrU, Fig. 2 y 3). Como el protocolo de experimentación excluía los somas neuronales que daban origen a dichos axones, los ARN neo-sintetizados sólo podían ser provistos por la célula de Schwann. A baja magnificación (microscopía confocal) se observaba la

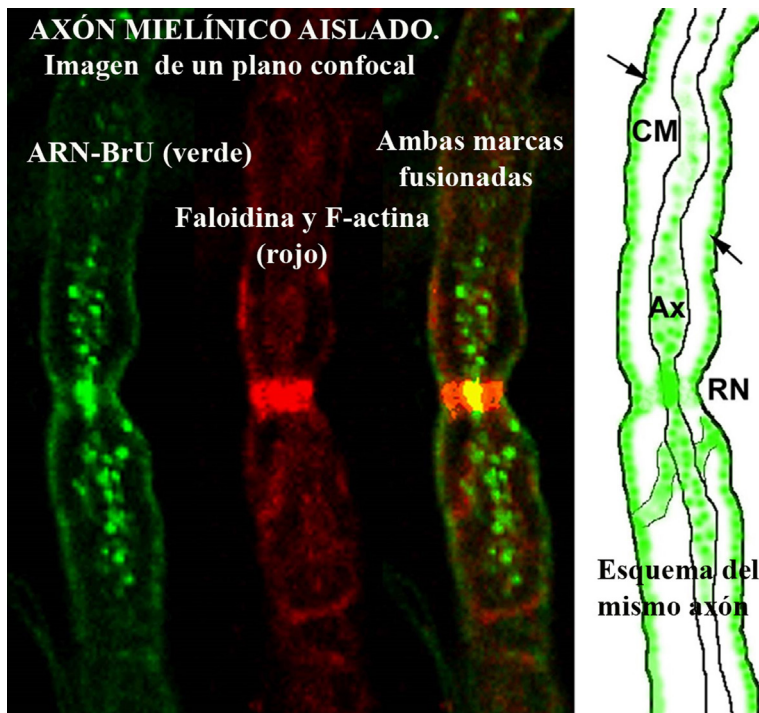


Figura 3. Imagen de un plano confocal de una fibra aislada que incluye la zona del Nodo de Ranvier (RN).

En verde, la fluorescencia que corresponde al ARN-BrU; en Rojo, la fluorescencia que corresponde a la faloidina-F-actina (cada una se origina por la excitación con dos láseres distintos). La tercer imagen corresponde a las dos fluorescencias simultáneas en la misma imagen. De una forma grosera, se piensa que cuando ambas fluorescencias están muy cercanas (superpuestas) el color se transforma en la suma de ambas (amarillo).

acumulación de los ARN-BrU en las puntas cortadas (18 horas antes) de los axones. Paralelamente, estos ARN sólo colocalizaban parcialmente con ribosomas (que también se acumulan en las puntas cortadas de los axones) detectados por inmunocitoquímica, lo que significa que si los ribosomas también se transfieren como se detectó [51, 52], quizás sigan caminos de transferencia diferentes. La co-localización también puede significar que esos ARN, si son mensajeros, pueden estar siendo traducidos a proteínas. Los ribosomas pueden ser de ambos orígenes (del soma neuronal o de la célula de Schwann, o sea que podían estar en ese lugar antes de la transferencia de los ARN-BrU marcados en la célula de Schwann. ARN-BrU puede ser ARNm, ARNr, ARNt o ARNmi. El origen mitocondrial de este ARN fue descartado porque no co-localizaba con mitocondrias. Cuando se marcó los ARN con BrU en presencia de α -amanitina (10 mg/ml), la marca se redujo un 50% lo que sugiere que al menos una gran parte de los ARN-BrU son

mensajeros ya que la α -amanitina inhibe la ARN-Polimerasa II. La acción de la latrunculina A (que desensambla el citoesqueleto de actina), a la concentración de 1.8 μ g/ml interrumpía totalmente la transferencia del ARN al axón. Förster resonance energy transfer (FRET) cuantitativo confocal demostró que el ARN-BrU estaba asociado a nivel molecular con la miosina Va. La mejor señal de FRET se dio en la región de los nodos de Ranvier. Esto sugiere que estos dos tipos de moléculas cumplen funciones diferentes según la localización en la que se encuentren [74]. Por último, los ratones mutantes [dilute-lethal (Myo5ad-l20J/Myo5ad-l20J) null mutant], tienen ARN-BrU detectable en las células de Schwann pero no en los axones. Esto demuestra claramente que la transferencia del ARN desde la célula de Schwann al axón es dependiente de la miosina Va.

D) Transferencia intercelular de ARN en el Sistema Nervioso Central

La demostración experimental de este fenómeno ha crecido en los últimos años [76-77]. Todos estos casos están relacionados con la transferencia de distintos sistemas de vesículas membranosas, tales como los exosomas (Ex), las vesículas extracelulares (Ve) y las vesículas exo-endo-citoplasmática (EEC), cada una con diversos contenidos. Daremos sólo algunos ejemplos ya que existen muchas publicaciones especializadas.

D.1 Relación metabólica entre las Glías y las Neuronas en el Sistema Nervioso Central

Las interacciones recíprocas entre las neuronas y los oligodendrocitos no son sólo necesarios para la mielinación sino también para la supervivencia a largo plazo de los axones. La degeneración de los axones subsecuente a muchas enfermedades mielínicas también es muy conocida a pesar de lo poco que se sabe sobre los mecanismos de comunicación molecular axo-gliales que mantienen la integridad axonal. Ha sido demostrada la transferencia de exosomas de los oligodendrocitos a las neuronas mediada por neurotransmisores como el glutamato que dispara la secreción de exosomas mediada por la entrada de Ca^{2+} a través de los receptores NMDA y AMPA de los oligodendrocitos [76, 77].

Los exosomas se generan en cuerpos multivesiculares que se unen a las membranas y vuelcan su contenido al espacio extracelular. Por su parte, los axones o las dendritas y los somas neuronales internalizan por endocitosis los exosomas gliales. La introducción de exosomas purificados de glías en los cuales se marcaron proteínas y ARN con moléculas fluorescentes, mostraron su capacidad de transferirse a neuronas cerebrales que de esa forma incorporaron las proteínas y ARNs fluorescentes. La endocitosis de los exosomas por las neuronas es dependiente de clatrina y dinamina. La endocitosis de exosomas que contienen ARNm y micro ARN, tienen efectos moduladores de funciones blanco neuronales.

Estos exosomas cargan proteínas específicas y ARN. La transferencia de exosomas oligodendrogiales a las neuronas mejora la viabilidad de aquellas neuronas que sufrían condiciones de stress celular. Esto indica que los exosomas oligodendrogiales participan en una novedosa comunicación neuro-glial bidireccional que contribuye a la integridad neuronal. Los ratones deficientes en algunas proteínas gliales (PLP y CNP) que se demostró eran transferidas a las neuronas

por los exosomas, sufrieron degeneración axonal a pesar de poseer una mielina que del punto de vista morfológico era normal.

D.2 La transferencia intercelular de exosomas y las patologías degenerativas

En numerosas enfermedades neurodegenerativas la interacción entre neuronas y glía modula el resultado de la progresión de una patología. En la interacción entre neuronas, astrocitos, microglías y oligodendrocitos se caracteriza por la liberación de vesículas extracelulares que transportan proteínas, lípidos y nucleótidos de una célula a otra. Son ejemplos relevantes la transferencia de proteínas que producen enfermedades como la proteína priónica o el mutante SOD1, que al penetrar en las neuronas mediado por exosomas gatillan la patología *in vitro*. Estos casos han sido descritos y enumerados por Basso y Bonetto [77].

Conclusiones

Cualquier transferencia de ARN y/o ribosomas entre dos tipos celulares distintos, requiere atravesar dos membranas biológicas. Por lo cual los hace difícil de entender. En el caso de los nervios mielínicos la complejidad se hace aún mayor, sin embargo la mielina compacta en los nervios mielínicos se interrumpe en dos lugares específicos, las incisuras de Schmidt-Lanterman y los nodos de Ranvier. Estos lugares parecen ser los elegidos por la evolución para que ocurra la transferencia. La transendocitosis por medio de vesículas (exosomas) y exo-endocitosis han sido propuestos como los mecanismos involucrados en la transferencia. Muchas vesículas han sido registradas por distintos autores. Desentrañar estos mecanismos están entre los objetivos más cercanos de los investigadores interesados en estos temas. A largo plazo se visualizan la posibilidad de resolver distintas patologías neurodegenerativas o injurias accidentales que afectan a los axones utilizando la biología molecular y celular y modificaciones de los mecanismos de transferencia células-a-célula de ARN modificados artificialmente.

Nota histórica sobre el origen del tema tratado en este artículo en el Instituto de Investigaciones Clemente Estable (IIBCE)

Como este artículo de revisión va dirigido a la revista nacional uruguaya Anales de la Facultad de Medicina, me parece importante escribir un pequeño capítulo aparte para contar como se originó el tema de la “Síntesis Proteica Axonal” en nuestro laboratorio. Comencé a trabajar de forma honoraria (1971) en el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), en lo que en aquella época era el Departamento de Biofísica dirigido por Carlos M. Franchi, quien propuso estudiar el metabolismo del proceso de la regeneración axonal. Para ello propuso utilizar como herramienta los metabolitos marcados con radioisótopos. Para poder detectarlos y medirlos él había construido con sus propias manos, utilizando repuestos descartados de equipos de aviación (que consiguió como regalo en el Aeropuerto de Carrasco), un contador de centelleo líquido (el primero que existió en el país). Estos equipos construidos por Franchi fueron realizados en colaboración con Claudio Benech. Ambos también construyeron un contador de “bajo nivel” con el fin de registrar los radioisótopos generados por las explosiones atómicas experimentales realizadas por Francia en el Atolón de Mururoa (Océano Pacífico Sur). Los radioisótopos son transportados por los vientos latitudinales y contaminaban Sud-América ya que las lluvias los arrastran al suelo (Fall-out). Claudio Benech diseñó un dispositivo para marcar un nervio que consistía en un tubo plástico cortado en media caña donde se colocaba el nervio y se taponeaba con vaselina o grasa de silicona y en su interior se colocaba solución Ringer con aminoácidos tritizados o uridina tritizada (ver figura 1). Se podía medir la incorporación del precursor (por disminución de la marcación en el líquido), o extirpando el nervio marcado al final del experimento.

Por otra parte Sotelo Sr. (José Roberto Sotelo Lotufo), estudió los cambios morfológicos que ocurren en los axones luego de una axonotmesis (sección total axonal) a lo largo del tiempo desde los primeros 30 minutos hasta los 4 días utilizando microscopía electrónica y publicó el primer artículo mundial relativo al tema (Wettstein R, Sotelo JR. Electron microscope study on the regenerative process of peripheral nerves of mice. *Z. Zellforsch Mikrosk Anat.* 1963;59:708-30).

Referencias

1. Weiss P, Hiscoe HB. Experiments on the mechanism of nerve growth. *J Exp Zool.* 1948;107:315-95.
2. Brady ST, Lasek RJ, Allen RD. Video microscopy of fast axonal transport in extruded axoplasm: a new model for study of molecular mechanisms. *Cell Motil.* 1985;5(2):81-101.
3. Lasek RJ. Protein transport in neurons. *Int Rev Neurobiol.* 1970;13:289-324.
4. Aschrafi A, Schwechter AD, Mameza MG, Natera-Naranjo O, Gioio AE, Kaplan BB. MicroRNA-338 regulates local cytochrome c oxidase IV mRNA levels and oxidative phosphorylation in the axons of sympathetic neurons. *J Neurosci.* 2008;28(47):12581–90. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3338-08.2008>
5. Bassell GJ, Zhang H, Byrd AL, Femino AM, Singer RH, Taneja KL, et al. Sorting of beta-actin mRNA and protein to neurites and growth cones in culture. *J Neurosci.* 1998;18:251–65.
6. Benech C, Sotelo JR Jr, Menendez J, Correa-Luna R. Autoradiographic study of RNA

- and protein synthesis in sectioned peripheral nerves. *Exp Neurol.* 1982; 76:72–82. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-4886\(82\)90102-9](http://dx.doi.org/10.1016/0014-4886(82)90102-9)
7. Calliari A, Fariás J, Puppo A, Canclini L, Mercer J A, Munroe D, et al. Myosin Va associates with mRNA in ribonucleoprotein particles present in myelinated peripheral axons and in the central nervous system *Dev Neurobiol.* 2014 Mar;74(3):382-96. <http://dx.doi.org/10.1002/dneu.22155>
 8. Edstrom JE, Eichner D, Edstrom A. The ribonucleic acid of axons and myelin sheaths from Mauthner neurons. *Biochim Biophys Acta.* 1962;61:178–84.
 9. Eng H, Lund K, Campenot RB. Synthesis of beta-tubulin, actin, and other proteins in axons of sympathetic neurons in compartmented cultures. *J Neurosci.* 1999 Jan;19(1):1–9.
 10. Gumy LF, Yeo GS, Tung YC, Zivraj KH, Willis D, Coppola G, et al. Transcriptome analysis of embryonic and adult sensory axons reveals changes in mRNA repertoire localization. *RNA.* 2011;17(1):85–98. <http://dx.doi.org/10.1261/rna.2386111>
 11. Kaplan BB, Gioio AE, Hillefors M, Aschrafi A. Axonal protein synthesis and the regulation of local mitochondrial function. *Results Probl Cell Differ.* 2009;48:225–42. http://dx.doi.org/10.1007/400_2009_1
 12. Koenig E. Synthetic mechanisms in the axon. IV. In vitro incorporation of [3H]precursors into axonal protein and RNA. *J Neurochem.* 1967;14(4):437–46. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.1967.tb09542.x>
 13. Koenig E. Evaluation of local synthesis of axonal proteins in the goldfish Mauthner cell axon and axons of dorsal and ventral roots of the rat in vitro. *Mol Cell Neurosci.* 1991;2(5):384–94. [http://dx.doi.org/10.1016/1044-7431\(91\)90025-J](http://dx.doi.org/10.1016/1044-7431(91)90025-J)
 14. Koenig E, Martin R. Cortical plaque-like structures identify ribosome-containing domains in the Mauthner cell axon. *J Neurosci.* 1996;16(4):1400–11.
 15. Koenig E, Martin R, Titmus M, Sotelo-Silveira JR. Cryptic peripheral ribosomal domains distributed intermittently along mammalian myelinated axons. *J Neurosci.* 2000;20(22):8390–400.
 16. Kun A, Otero L, Sotelo-Silveira JR, Sotelo JR. Ribosomal distributions in axons of mammalian myelinated fibers. *J Neurosci Res.* 2007;85(10):2087–98. <http://dx.doi.org/10.1002/jnr.21340>
 17. Natera-Naranjo O, Aschrafi A, Gioio AE, Kaplan BB. Identification and quantitative analyses of microRNAs located in the distal axons of sympathetic neurons. *RNA.* 2010;16(8):1516–29. <http://dx.doi.org/10.1261/rna.1833310>
 18. Sotelo JR, Benech CR, Kun A. Local radiolabeling of the 68 kDa neurofilament protein in rat sciatic nerves. *Neurosci Lett.* 1992;144(1-2):174–6.
 19. Sotelo-Silveira JR, Calliari A, Kun A, Benech JC, Sanguinetti C, Chalar, C. Sotelo JR. Neurofilament mRNAs are present and translated in the normal and severed sciatic nerve. *J Neurosci Res.* 2000;62(1):65–74. [http://dx.doi.org/10.1002/1097-4547\(20001001\)62:1<65::AID-JNR7>3.0.CO;2-Z](http://dx.doi.org/10.1002/1097-4547(20001001)62:1<65::AID-JNR7>3.0.CO;2-Z)
 20. Sotelo-Silveira JR, Calliari A, Cardenas M, Koenig E, Sotelo JR. Myosin Va and kinesin II motor proteins are concentrated in ribosomal domains (periaxoplasmic ribosomal plaques) of myelinated axons. *J Neurobiol.* 2004;60(2):187–96.
 21. Tasaki I, Hagiwara S. Demonstration of two stable potential states in the squid giant axon under tetraethylammonium chloride. *J Gen Physiol.* 1957;40(6):859-85.
 22. Willis D, Li KW, Zheng JQ, Chang JH, Smit AB, Kelly T, et al. Differential transport and local translation of cytoskeletal, injury-response, and neurodegeneration protein mRNAs in axons. *J Neurosci.* 2005;25(4):778–91. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4547-04.2005>

- org/10.1523/JNEUROSCI.4235-04.2005
23. Willis DE, van Niekerk EA, Sasaki Y, Mesngon M, Merianda TT, Williams GG, et al. Extracellular stimuli specifically regulate localized levels of individual neuronal mRNAs. *J Cell Biol.* 2007;178(6):965–80. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200703209>
 24. Willis DE, Xu M, Donnelly CJ, Tep C, Kendall M, Erenstheyn M, et al. Axonal Localization of transgene mRNA in mature PNS and CNS neurons. *J Neurosci.* 2011;31(41):14481–7. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2950-11.2011>
 25. Zhang HL, Eom T, Oleynikov Y, Shenoy SM, Liebelt DA, Dictenberg JB, et al. Neurotrophin-induced transport of a beta-actin mRNP complex increases beta-actin levels and stimulates growth cone motility. *Neuron.* 2001;31(2):261–75. [http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00357-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00357-9)
 26. Zhang HL, Singer RH, Bassell GJ. Neurotrophin regulation of beta-actin mRNA and protein localization within growth cones. *J Cell Biol.* 1999;147(1):59–70. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.147.1.59>
 27. Zivraj KH, Tung YC, Piper M, Gumy L, Fawcett JW, Yeo GS, et al. Subcellular profiling reveals distinct and developmentally regulated repertoire of growth cone mRNAs. *J Neurosci.* 2010;30(46):15464–78. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1800-10.2010>
 28. Alvarez J, Giuditta A, Koenig E. Protein synthesis in axons and terminals: significance for maintenance, plasticity and regulation of phenotype. With a critique of slow transport theory. *Prog Neurobiol.* 2000;62(1):1–62. [http://dx.doi.org/10.1016/S0301-0082\(99\)00062-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0301-0082(99)00062-3)
 29. Eyman M, Cefaliello C, Ferrara E, De Stefano R, Lavina ZS, Crispino M, et al. Local synthesis of axonal and presynaptic RNA in squid model systems. *Eur J Neurosci.* 2007;25(2):341–50. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05304.x>
 30. Gainer H, Tasaki I, Lasek RJ. Evidence for the glia-neuron protein transfer hypothesis from intracellular perfusion studies of squid giant axons. *J Cell Biol.* 1977;74(2):524–30.
 31. Giuditta A, Kaplan BB, van Minnen J, Alvarez J, Koenig E. Axonal and presynaptic protein synthesis: new insights into the biology of the neuron. *Trends Neurosci.* 2002;25(8):400–4. [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-2236\(02\)02188-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-2236(02)02188-4)
 32. Koenig E, Giuditta A. Protein-synthesizing machinery in the axon compartment. *Neuroscience.* 1999;89(1):5–15. [http://dx.doi.org/10.1016/S0306-4522\(98\)00282-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0306-4522(98)00282-6)
 33. Piper M, Holt C. RNA translation in axons. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004;20:505–23. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.010403.111746>
 34. Sotelo-Silveira JR, Calliari A, Kun A, Koenig E, Sotelo JR. RNA trafficking in axons. *Traffic.* 2006;7(5):508–15. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0854.2006.00405.x>
 35. Taylor AM, Berchtold NC, Perreau VM, Tu CH, Li Jeon N, Cotman CW. Axonal mRNA in uninjured and regenerating cortical mammalian axons. *J Neurosci.* 2009;29(15):4697–707.
 36. Taylor AM, Wu J, Tai HC, Schuman EM. Axonal translation of beta-catenin regulates synaptic vesicle dynamics. *J Neurosci.* 2013;33(13):5584–9. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2944-12.2013>
 37. Bassell GJ, Oleynikov Y, Singer RH. The travels of mRNAs through all cells large and small. *FASEB J.* 1999;13:447–54.
 38. Bassell GJ, Singer RH. Neuronal RNA localization and the cytoskeleton. *Results Probl Cell Differ.* 2001;34:41–56.
 39. Ben-Yaakov K, Dagan SY, Segal-Ruder Y, Shalem O, Vuppalanchi D, Willis DE, et al. Axonal transcription factors signal retrogradely in lesioned peripheral nerve. *EMBO J.* 2012;31(6):1350–63. <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2011.494>

40. Sotelo-Silveira J, Crispino M, Puppo A, Sotelo JR, Koenig E. Myelinated axons contain beta-actin mRNA and ZBP-1 in periaxoplasmic ribosomal plaques and depend on cyclic AMP and F-actin integrity for in vitro translation. *J Neurochem.* 2008;104:545–57. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04999.x>
41. Long RM, Gu W, Lorimer E, Singer RH, Chartrand P. She2p is a novel RNA-binding protein that recruits the Myo4p-She3p complex to ASH1 mRNA. *EMBO J.* 2000;19(23):6592–601. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/19.23.6592>
42. Long RM, Singer RH, Meng X, Gonzalez I, Nasmyth K, Jansen RP. Mating type switching in yeast controlled by asymmetric localization of ASH1 mRNA. *Science.* 1997;277(5324):383–7.
43. Vogelaar CF, Gervasi NM, Gummy LF, Story DJ, Raha-Chowdhury R, Leung KM, et al. Axonal mRNAs: Characterisation and role in the growth and regeneration of dorsal root ganglion axons and growth cones. *Mol Cell Neurosci.* 2009;42(2):102–15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcn.2009.06.002>
44. Rapallino MV, Cupello A, Giuditta A. Axoplasmic RNA species synthesized in the isolated squid giant axon. *Neurochem Res.* 1988;13(7):625–31.
45. Sotelo JR, Canclini L, Kun A, Sotelo-Silveira JR, Xu L, Wallrabe H, et al. Myosin-Va-dependent cell-to-cell transfer of RNA from Schwann cells to axons. *PLoS One* [Internet]. 2013 [consultado 2016 jul 22];8(4):e61905. Disponible en: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0061905> <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0061905>. Print 2013
46. Zelena J. Ribosome-like particles in myelinated axons of the rat. *Brain Res.* 1970;24(2):359–63. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(70\)90120-4](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(70)90120-4)
47. Zelena J. Ribosomes in myelinated axons of dorsal root ganglia. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 1972;124(2):217–29.
48. Zelena J. Ribosomes in the axoplasm of myelinated nerve fibres. *Folia Morphol (Praha).* 1972. 20(1):91–3.
49. Li YC, Cheng CX, Li YN, Shimada O, Atsumi S. Beyond the initial axon segment of the spinal motor axon: fasciculated microtubules and polyribosomal clusters. *J Anat.* 2005;206(6):535–42. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-7580.2005.00418.x>
50. Li YC, Li YN, Cheng CX, Sakamoto H, Kawate T, Shimada O, et al. Subsurface cisterna-lined axonal invaginations and double-walled vesicles at the axonal-myelin sheath interface. *Neurosci Res.* 2005;53(3):298–303. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neures.2005.07.006>
51. Court FA, Hendriks WT, MacGillavry HD, Alvarez J, van Minnen J. Schwann cell to axon transfer of ribosomes: toward a novel understanding of the role of glia in the nervous system. *J Neurosci.* 2008;28(43):11024–9. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2429-08.2008>
52. Court FA, Midha R, Cisterna BA, Grochmal J, Shakhbazau A, Hendriks WT, et al. Morphological evidence for a transport of ribosomes from Schwann cells to regenerating axons. *Glia.* 2011;59(10):1529–39. <http://dx.doi.org/10.1002/glia.21196>
53. Singer M, Green MR. Autoradiographic studies of uridine incorporation in peripheral nerve of the newt, *Triturus*. *J Morphol.* 1968;124(3):321–44.
54. Rustom A, Saffrich R, Markovic I, Walther P, Gerdes HH. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science.* 2004;303(5660):1007–10. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1093133>
55. Palacios IM. RNA processing: splicing and the cytoplasmic localisation of mRNA. *Curr Biol.* 2002;12(2):R50–R52. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00671-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00671-6)
56. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated

- transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007;9(6):654–9. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1596>
57. Boissy RE. Melanosome transfer to and translocation in the keratinocyte. *Exp Dermatol.* 2003;12 Suppl 2:5–12. <http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-0625.12.s2.1.x>
 58. Spees JL, Olson SD, Whitney MJ, Prockop DJ. Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103(5):1283–8. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0510511103>
 59. Lasek RJ, Gainer H, Barker JL. Cell-to-cell transfer of glial proteins to the squid giant axon. The glia-neuron protein transfer hypothesis. *J Cell Biol.* 1977;74(2):501–23.
 60. Tytell M, Lasek RJ, Gainer H. Axonal maintenance, glia, exosomes, and heat shock proteins. *F1000Res* [Internet]. 2016 [consultado 2016 jul 22];5(F1000 Faculty Rev):205. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4765724/> <http://dx.doi.org/10.12688/f1000research.7247.1>
 61. Lasek RJ, Gainer H, Przybylski RJ. Transfer of newly synthesized proteins from Schwann cells to the squid giant axon. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1974;71(4):118892.
 62. Giuditta A, Chun JT, Eyman M, Cefaliello C, Bruno AP, Crispino M. Local gene expression in axons and nerve endings: the glia-neuron unit. *Physiol Rev.* 2008;88(2):515–55. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00051.2006>
 63. Giuditta A, Kaplan BB, van Minnen J, Alvarez J, Koenig E. Axonal and presynaptic protein synthesis: new insights into the biology of the neuron. *Trends Neurosci.* 2002;25(8):400–4. [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-2236\(02\)02188-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-2236(02)02188-4)
 64. Kaplan BB, Gioio AE, Capano CP, Crispino M, Giuditta A. beta-Actin and beta-Tubulin are components of a heterogeneous mRNA population present in the squid giant axon. *Mol Cell Neurosci.* 1992;3(2):133–44. [http://dx.doi.org/10.1016/1044-7431\(92\)90017-V](http://dx.doi.org/10.1016/1044-7431(92)90017-V)
 65. Crispino M, Kaplan BB, Martin R, Alvarez J, Chun JT, Benech JC, et al. Active polysomes are present in the large presynaptic endings of the synaptosomal fraction from squid brain. *J Neurosci.* 1997;17(20):7694–702.
 66. Gambetti P, Autilio-Gambetti L, Shafer B, Pfaff LD. Quantitative autoradiographic study of labeled RNA in rabbit optic nerve after intraocular injection of [³H]uridine. *J Cell Biol.* 1973;59:677–84.
 67. Lunn ER, Perry VH, Brown MC, Rosen H, Gordon S. Absence of Wallerian degeneration does not hinder regeneration in peripheral nerve. *Eur J Neurosci.* 1989;1(1):27–33.
 68. Mack TG, Reiner M, Beirowski B, Mi W, Emanuelli M, Wagner D, Thomson D, et al. Wallerian degeneration of injured axons and synapses is delayed by a Ube4b/Nmnat chimeric gene. *Nat Neurosci.* 2001;4:1199–206. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.1989.tb00771.x>
 69. Araki T, Sasaki Y, Milbrandt J. Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration. *Science.* 2004;305(5686):1010–3. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1098014>
 70. Coleman MP, Conforti L, Buckmaster EA, Tarlton A, Ewing RM, Brown MC, et al. An 85-kb tandem triplication in the slow Wallerian degeneration (Wlds) mouse. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95(17):9985–90.
 71. Conforti L, Fang G, Beirowski B, Wang MS, Sorci L, Asress S, et al. NAD(+) and axon degeneration revisited: Nmnat1 cannot substitute for Wld(S) to delay Wallerian degeneration. *Cell Death Differ.* 2007;14(1):116–27. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.cdd.4401944>
 72. Shakhbazau A, Schenk GJ, Hay C, Kawasoe J, Klaver R, Yong VW, et al. Demyelination induces transport of ribosome-containing vesicles from glia to axons: evidence from animal models and MS patient brains. *Mol Biol Rep.* 2016;43(6):495–507. <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-016-3990-2>

73. Massardo L, Burgos P, Martinez ME, Perez R, Calvo M, Barros J, et al. Antiribosomal P protein antibodies in Chilean SLE patients: no association with renal disease. *Lupus*. 2002;11(6):379–83.
74. Canclini L, Wallrabe H, Di Paolo P, Kun A, Calliari A, Sotelo-Silveira JR, et al. Association of Myosin Va and Schwann Cells-derived RNA in mammal myelinated axons, analyzed by immunocytochemistry and confocal FRET microscopy. *Methods*. 2014;66(2):153–61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.06.007>
75. Frühbeis C1, Fröhlich D, Kuo WP, Amphornrat J, Thilemann S, Saab AS, et al. Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte-neuron communication. *PLoS Biol* [Internet]. 2013 [consultado 2016 jul 22];11(7):e1001604. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1001604>
76. Frühbeis C, Fröhlich D, Kuo WP, Krämer-Albers EM. Extracellular vesicles as mediators of neuron-glia communication. *Front Cell Neurosci*. 2013;7:182. <http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2013.00182>.
77. Basso M, Bonetto V. Extracellular vesicles and a novel form of communication in the brain. *Front Neurosci*. 2016;10:127. <http://dx.doi.org/10.3389/fnins.2016.00127>. eCollection 2016.