

UCH-FC  
DOC-BMCN  
L 926  
C. 1



# **“EFECTOS DE EXOSOMAS PORTADORES DE ALDOLASA C EN NEURONAS”**

**Tesis**

**Entregada a la**

**Universidad de Chile**

**En Cumplimiento de los Requisitos**

**Para Optar al Grado de**

**Doctor en Ciencias con Mención en Biología Molecular,**

**Celular y Neurociencias**

**Facultad de Ciencias**

**por**

**Alejandro Luarte Navarro**

**Septiembre, 2016**

**Directores de Tesis:**

**Dra. Úrsula Wyneken.**

**Dra. Cecilia Vergara.**

**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**INFORME DE APROBACION**  
**TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

**Alejandro Ernesto Luarte Navarro.**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día Martes 28 de Junio de 2016.

Director de Tesis:

Dra. Úrsula Wyneken Hempel.



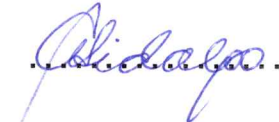
Co-Director de Tesis:

Dra. Cecilia Vergara Montecinos.



Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dra. Cecilia Hidalgo Tapia.



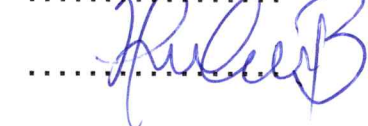
Dr. Felipe Court Goldsmith.

.....

Dr. Álvaro Glavic Maurer.



Dr. Christian González Billault .



***"Debemos, y gracias al progreso científico, podemos, edificar una sociedad post-industrial de forma que la práctica de la creatividad de una persona no imponga jamás a otra un trabajo, un saber, o un consumo obligatorio".***

**Iván Illich.**

... de la creatividad de una persona no imponga jamás a otra un trabajo, un saber, o un consumo obligatorio. ...



**Alejandro Luarte Navarro** nació en Santiago el 22 de Enero de 1984, cursó sus estudios escolares secundarios en el Liceo José Victorino Lastarria para luego estudiar Bioquímica en la Universidad de Chile, terminando su tesis en el año 2011, la que desarrolló en el laboratorio de Neurociencias de la Universidad de los Andes, bajo la tutoría de Dra. Úrsula Wyneken Hempel. Durante el desarrollo de su tesis doctoral, participó activamente en actividades docentes y realizó una estadía de investigación en el Leibniz Institute of Neurobiology.

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a la Dra. Úrsula Wyneken por brindarme su conocimiento, apoyo y confianza en momentos claves de este trabajo, propiciando un grato ambiente de investigación donde no hay límites preconcebidos para hacer mejor Ciencia. Este período académico ha sido de un intenso aprendizaje.

Mi gratitud a la Dra. Cecilia Vergara por su labor como co-tutora de tesis, su apoyo fue muy significativo para la revisión de los datos, pero además deseo agradecer su gran gentileza durante todo este proceso.

También deseo agradecer a Soledad Sandoval quien es un constante apoyo científico para todos en el laboratorio, pero además desarrolló otra labor "no cuantificable" de gran preocupación y trato humano que hizo más feliz el trabajo experimental.

Este período en el laboratorio ha sido confluencia de buenos compañeros y amigos que se juntaron para que los astros fueran propicios. Tengo la certeza de que este logro es colectivo y agradezco a: Estíbaliz Ampuero, Javier Rubio, Mauricio Sandoval, Ariel Caviedes, Katherine Corvalán, Teresa Gómez, Manuel Varas, Matías Masalleras, Isabel Villalobos, Juan Pablo Ramírez, Cristóbal Gómez, David Quinteros, Diego Gaete, Bárbara Maturana, Verónica Martínez, Pablo Cisternas, Carlos Lafourcade, René Milla, Rodrigo Herrera, Nicole Reichenbach, Raúl Castillo y Katy Ferrat.

Agradezco a mis otros amigos, los de larga data, que han tolerado largas ausencias por mi trabajo, y sin embargo, siguen presentes.

Agradezco a mi familia, a mi madre, por su apoyo incondicional, a Polo, ambos han sido fundamentales, brindándome inmenso cariño y comprensión.

Finalmente, quiero agradecer a Paulina por su amor, compañía y ayuda en tantos sentidos, en todos los momentos importantes de mi vida. Gracias por el futuro.

## TABLA DE CONTENIDOS

|                                                                      |     |
|----------------------------------------------------------------------|-----|
| DEDICATORIA.....                                                     | ii  |
| AGRADECIMIENTOS.....                                                 | iii |
| TABLA DE CONTENIDOS.....                                             | iv  |
| ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....                                      | vii |
| LISTA DE ABREVIATURAS .....                                          | x   |
| RESUMEN .....                                                        | xii |
| ABSTRACT .....                                                       | xv  |
| INTRODUCCIÓN .....                                                   | 1   |
| I. Vesículas extracelulares.....                                     | 1   |
| II. Biogénesis de los exosomas.....                                  | 2   |
| III. Composición de los exosomas. ....                               | 5   |
| 1.    Proteínas:.....                                                | 5   |
| 2.    Lípidos:.....                                                  | 6   |
| 3.    Ácidos nucleicos:.....                                         | 7   |
| IV. Características y biogénesis de los miRNAs.....                  | 8   |
| V. Mecanismos de interacción de exosomas con células blanco.....     | 11  |
| VI. Participación de exosomas en la respuesta al estrés crónico..... | 14  |
| VII. Características de aldolasa C.....                              | 15  |
| VIII. Relevancia de la interacción astrocito-neurona en el SNC.....  | 16  |
| IX. Potenciales efectos de aldolasa C en la función neuronal.....    | 20  |
| X. Características de miR26a.....                                    | 23  |
| <br>                                                                 |     |
| HIPÓTESIS.....                                                       | 27  |
| OBJETIVO GENERAL.....                                                | 27  |
| I. Objetivos específicos.....                                        | 27  |
| <br>                                                                 |     |
| MATERIALES Y MÉTODOS.....                                            | 28  |
| I. Modelo animal.....                                                | 28  |
| II. Protocolo de estrés en ratas.....                                | 28  |
| III. Extracción de Líquido cefalorraquídeo (LCR).....                | 29  |
| IV. Electroporación <i>in utero</i> .....                            | 29  |
| V. Plasmidios.....                                                   | 30  |
| VI. Cultivos de astrocitos puros.....                                | 31  |
| VII. Cultivos neuronales puros y mixtos.....                         | 32  |
| VIII. Co-cultivo de neuronas y astrocitos electroporados.....        | 33  |

|                                                                                                                                                            |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| IX. Estimulación de cultivos puros de astrocitos y co-cultivos con corticosterona. ....                                                                    | 33  |
| X. Transfección de mimic e inhibidor de miRNA. ....                                                                                                        | 34  |
| XI. Obtención/purificación de exosomas. ....                                                                                                               | 35  |
| XII. Ensayo de protección a proteasas. ....                                                                                                                | 36  |
| XIII. Análisis de vesículas por microscopia electrónica. ....                                                                                              | 36  |
| XIV. Análisis de seguimiento de nano-partículas. ....                                                                                                      | 36  |
| XV. Experimento de flotación de exosomas en gradiente de densidad continuo de sacarosa. ....                                                               | 37  |
| XVI. Estimulación de neuronas con exosomas aislados desde astrocitos. ....                                                                                 | 37  |
| XVII. Análisis morfológico de Neuronas. ....                                                                                                               | 38  |
| XVIII. Inmunocitoquímica. ....                                                                                                                             | 39  |
| XIX. Análisis de colocalización en cultivos de astrocitos. ....                                                                                            | 40  |
| XX. Western Blot. ....                                                                                                                                     | 41  |
| XXI. Perfusión de los animales. ....                                                                                                                       | 42  |
| XXII. Inmunohistoquímica. ....                                                                                                                             | 42  |
| XXIII. Inmunoprecipitación (IP) de aldolasa C. ....                                                                                                        | 43  |
| XXIV. Extracción de RNAs. ....                                                                                                                             | 44  |
| XXV. RT-PCR cuantitativo de miRNAs. ....                                                                                                                   | 45  |
| XXVI. Anticuerpos primarios. ....                                                                                                                          | 47  |
| XXVII. Anticuerpos secundarios. ....                                                                                                                       | 48  |
| XXVIII. Análisis estadístico. ....                                                                                                                         | 48  |
| RESULTADOS. ....                                                                                                                                           | 49  |
| I. Aldolasa C está presente en exosomas de astrocitos. ....                                                                                                | 499 |
| II. Aldolasa C co-distribuye con marcadores de exosomas en gradiente de densidad dentro del lumen de los exosomas. ....                                    | 54  |
| III. Aldolasa C está presente en exosomas de líquido cefalorraquídeo (LCR) y aumenta en respuesta a un protocolo de estrés. ....                           | 56  |
| IV. Destinación aldolasa C-GFP a exosomas. ....                                                                                                            | 58  |
| V. .. Transferencia de aldolasa C-GFP a neuronas mediante exosomas y en co-cultivo. ....                                                                   | 61  |
| VI. Corticosterona induce transferencia de aldolasa C-GFP a neuronas posiblemente mediada por exosomas. ....                                               | 67  |
| VII. Contenido de miR-26a-5p aumenta en homogenizados y exosomas de astrocitos que sobre-expresan aldolasa C-GFP. ....                                     | 69  |
| VIII. Exosomas de astrocitos que sobre-expresan aldolasa C-GFP disminuyen la complejidad y largo de los procesos neuríticos en neuronas hipocampales. .... | 73  |

|                                                                                                                                                          |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| IX. Exosomas derivados de astrocitos que sobre-expresan aldolasa C-GFP afectan la morfología de neuronas hipocampales, pero no corticales. ....          | 78  |
| X. Mimic de miR-26a-5p recapitula los efectos morfológicos inducidos por exosomas que contienen aldolasa C-GFP.....                                      | 81  |
| XI. Inhibición de miR-26a-5p bloquea los efectos morfológicos inducidos por exosomas de astrocitos que sobre-expresan aldolasa C-GFP. ....               | 86  |
| XII. Genes potencialmente regulados por miR-26a-5p tienen preferencia por procesos biológicos relacionados al citoesqueleto neuronal y la vía Wnt.....   | 89  |
| DISCUSIÓN .....                                                                                                                                          | 93  |
| I. Pureza de la fracción exosomal. ....                                                                                                                  | 93  |
| II. Incorporación de exosomas a neuronas. ....                                                                                                           | 97  |
| III. Efecto de la sobre-expresión de aldolasa C-GFP y destinación a exosomas. ....                                                                       | 100 |
| IV. Potencial relevancia de la presencia de aldolasa C en exosomas in vivo..                                                                             | 100 |
| V. Enriquecimiento de miR-26a-5p en astrocitos. ....                                                                                                     | 103 |
| VI. Regulación del contenido de miR-26a-5p en exosomas por aldolasa C...                                                                                 | 104 |
| VII. Implicancia de las funciones no-canónicas de aldolasa C.....                                                                                        | 105 |
| VIII. Regulación de la morfología neuronas por exosomas de astrocitos. ....                                                                              | 106 |
| IX. Participación de miR 26a-5p en los efectos morfológicos inducidos por exosomas de astrocitos. ....                                                   | 108 |
| X. Posibles mecanismos que median el efecto de miR-26a-5p sobre la morfología .....                                                                      | 110 |
| XI. Selectividad en el efecto de los exosomas de astrocitos y miR-26a-5p sobre neuronas corticales e hipocampales. ....                                  | 113 |
| XII. Potencial participación de aldolasa C y miR-26 en patologías neurológicas relacionadas al stress. ....                                              | 117 |
| 1. Regulación del contenido de aldolasa C en enfermedades relacionadas al stress: .....                                                                  | 117 |
| 2. Regulación del contenido de miR-26a en patologías relacionadas con el stress:.....                                                                    | 120 |
| XIII. Relevancia de los cambios dendríticos inducidos por exosomas de astrocitos en neuronas hipocampales y su relación con la adaptación al estrés..... | 121 |
| CONCLUSIÓN.....                                                                                                                                          | 125 |
| REFERENCIAS.....                                                                                                                                         | 126 |



## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

|                                                                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Vesículas extracelulares.....                                                                                                                                | 2  |
| Figura 2. Biogénesis de exosomas. ....                                                                                                                                 | 4  |
| Figura 3. Composición molecular de los exosomas..                                                                                                                      | 7  |
| Figura 4. Biogénesis y función de los microRNAs (miRNAs).....                                                                                                          | 10 |
| Figura 5. Participación de los astrocitos en la regulación de la<br>función neuronal.....                                                                              | 20 |
| Figura 6. Identidad de la secuencia de las hebras de miR-26a con<br>la secuencia que une aldolasa C.....                                                               | 22 |
| Figura 7. Porcentaje de células GFAP positivas en cultivos<br>de astrocitos puros.....                                                                                 | 49 |
| Figura 8. Rendimiento en la producción de exosomas.....                                                                                                                | 50 |
| Figura 9. Caracterización de la fracción exosomal de cultivos<br>de astrocitos y mixtos.....                                                                           | 53 |
| Figura 10. Flotación de exosomas en gradiente continua de densidad y ensayo<br>de protección a proteasas.....                                                          | 55 |
| Figura 11. Expresión de aldolasa C en astrocitos de tejido<br>hipocampal.....                                                                                          | 56 |
| Figura 12. Aldolasa C está presente en exosomas de líquido cefalorraquídeo y<br>su contenido aumenta tras un protocolo de estrés por restricción de<br>movimiento..... | 57 |
| Figura 13. Aldolasa C-GFP es incorporada en exosomas de astrocitos<br>transfectados.....                                                                               | 60 |

|                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 14. Internalización de exosomas que contienen aldolasa C-GFP en neuronas.....                                                                         | 62 |
| Figura 15. MiR-26a-5p es transferido mediante exosomas de astrocitos a neuronas hipocampales.....                                                            | 65 |
| Figura 16. MiR-26a-5p induce disminución de los niveles de MAP 2 A/B en neuronas hipocampales, pero no corticales.....                                       | 66 |
| Figura 17. Costicosterona induce aumento en la cantidad de aldolasa C-GFP en el soma de neuronas corticales en co-cultivo con astrocitos electroporados..... | 68 |
| Figura 18. Contenido de miR-26a-5p y miR-26a-3p aumenta por sobre-expresión de aldolasa C-GFP.....                                                           | 70 |
| Figura 19. Aldolasa C co-inmunoprecipita con miR-26a-3p. A. inmunoprecipitación de Aldolasa C.....                                                           | 72 |
| Figura 20. Exosomas de astrocitos que sobre-expresan aldolasa C-GFP disminuyen la complejidad y largo de los procesos neuríticos .....                       | 75 |
| Figura 21. Dosis-dependencia del efecto morfológico de exosomas de astrocitos que sobre-expresan aldolasa C-GFP.....                                         | 77 |
| Figura 22. Exosomas derivados de astrocitos que sobre-expresan aldolasa C-GFP afectan la morfología de neuronas hipocampales, pero no corticales.....        | 80 |
| Figura 23. Efectos morfológicos inducidos por mimic de miR-26a-5p en neuronas hipocampales.....                                                              | 83 |
| Figura 24. Efectos morfológicos inducidos por mimic de miR-26a-5p en neuronas corticales.....                                                                | 85 |
| Figura 25. Inhibición de miR-26a-5p bloquea los efectos morfológicos de exosomas de astrocitos que sobre-expresan aldolasa C-GFP.....                        | 88 |

|                                                                                                                                                                                                      |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 26. Blancos predichos para miR-26a-5p muestran preferencia por funciones asociadas a morfología neuronal, citoesqueleto y la vía Wnt respecto de otros miRNAs enriquecidos en astrocitos..... | 91  |
| Figura 27. Análisis de enriquecimiento de las rutas de señalización potencialmente reguladas por miR-26a-5p.....                                                                                     | 92  |
| Figura 28. Modelo propuesto según los resultados de esta tesis.....                                                                                                                                  | 123 |
| Tabla 1. Proteínas reguladas por miR-26a y su efecto en la morfología neuronal.....                                                                                                                  | 25  |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                        |                                                      |
|------------------------|------------------------------------------------------|
| <b>°C:</b>             | Grados Celsius.                                      |
| <b>ARN:</b>            | Ácido ribonucleico.                                  |
| <b>BCA:</b>            | Ácido bicinconánico.                                 |
| <b>BDNF:</b>           | Factor neurotrófico derivado de cerebro.             |
| <b>BSA:</b>            | Albúmina de suero bovino.                            |
| <b>DAPI:</b>           | 4',6-diamidino-2-fenilindol.                         |
| <b>DHAP:</b>           | Dihidroxiacetona fosfato.                            |
| <b>DMSO:</b>           | Dimetil sulfóxido.                                   |
| <b>EGTA:</b>           | Acido etilenglicol tetra acético.                    |
| <b>ELISA:</b>          | Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas.          |
| <b>FBS:</b>            | Suero fetal bovino.                                  |
| <b>GAP:</b>            | Gliceraldehído-3-fosfato.                            |
| <b>GFAP:</b>           | Proteína acídica fibrilar de glia.                   |
| <b>HEPES:</b>          | Ácido N-(2-Hidroxietil)piperazina-N'-etanosulfónico. |
| <b>HSB:</b>            | Tampón alto en sal.                                  |
| <b>IF:</b>             | Inmunofluorescencia.                                 |
| <b>IgG:</b>            | Inmunoglobulina.                                     |
| <b>IHF:</b>            | Inmunohistofluorescencia.                            |
| <b>IP:</b>             | Inmunoprecipitación.                                 |
| <b>IP<sub>3</sub>:</b> | Inositol trifosfato.                                 |
| <b>kDa:</b>            | Kilo Dalton.                                         |
| <b>LCR:</b>            | Líquido céfalo raquídeo.                             |
| <b>LDH:</b>            | Lactato deshidrogenasa.                              |

|                    |                                                     |
|--------------------|-----------------------------------------------------|
| <b>Lipid Raft:</b> | Balsas lipídicas.                                   |
| <b>MAP2:</b>       | Proteína asociada a microtúbulos 2.                 |
| <b>MAP2 A/B:</b>   | Proteína asociada a microtúbulos 2 subunidad A y B. |
| <b>ME:</b>         | Microscopía electrónica.                            |
| <b>MEM:</b>        | Medio mínimo de EAGLE.                              |
| <b>miRNA:</b>      | microRNA.                                           |
| <b>PAGE:</b>       | Electroforesis en gel de poliacrilamida.            |
| <b>PBS:</b>        | Tampón fosfato salino.                              |
| <b>PFA:</b>        | Paraformaldehído.                                   |
| <b>RIPA:</b>       | Tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación.       |
| <b>Scrambled:</b>  | Secuencia al azar de los oligonucleótidos usados.   |
| <b>SNC:</b>        | Sistema nervioso central.                           |
| <b>SDS:</b>        | Dodecilsulfato de sodio.                            |
| <b>SDS-PAGE:</b>   | Electroforesis en condiciones denaturates.          |
| <b>s.l.m.:</b>     | Stratum lacunosum moleculare.                       |
| <b>SNC:</b>        | Sistema nervioso central.                           |
| <b>s.o:</b>        | Stratum oriens.                                     |
| <b>s.p:</b>        | Stratum pyramidale.                                 |
| <b>s.r:</b>        | Stratum radiatum.                                   |
| <b>Tris:</b>       | Tris-(hidroximetil)-aminoetano.                     |
| <b>UTR:</b>        | Regiones no traducibles                             |
| <b>WB:</b>         | Western blot.                                       |

## RESUMEN

Los exosomas son nanovesículas extracelulares que podrían participar en procesos de señalización intercelular mediante su carga consistente en microRNAs (miRNA), lípidos y proteínas. En el sistema nervioso central (SNC), tanto astrocitos como neuronas podrían usar exosomas como una novedosa forma de comunicación.

Antecedentes del laboratorio de Neurociencias de La Universidad de Los Andes, obtenidos en ratas, muestran que los niveles extracelulares de proteínas que se expresan selectivamente en astrocitos, tales como aldolasa C y GFAP, aumentan en animales sometidos a estrés crónico. Parte de este aumento podría explicarse mediante su liberación en exosomas.

Los astrocitos son las células gliales más abundantes del SNC y son actores claves en la homeostasis cerebral, controlando los niveles extracelulares de iones, neurotransmisores, factores tróficos, flujo sanguíneo y el metabolismo neuronal. Sin embargo, hasta ahora, el efecto de los exosomas derivados de astrocitos sobre la función neuronal ha sido escasamente explorado.

Por otra parte, aldolasa C es una enzima glicolítica capaz de unir ácidos nucleicos cuya secuencia es similar a la de miRNA-26a (miR-26a). Este mi-RNA está enriquecido en astrocitos e induce la degradación de varias proteínas involucradas en la mantención de la actividad sináptica y citoarquitectura dendrítica, tales como la proteína asociada a microtúbulos (MAP2), el factor

neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) o glicógeno sintasa quinasa 3 beta (GSK3 $\beta$ ), entre otros.

Considerando estos antecedentes, nuestra hipótesis es: “Los exosomas de astrocitos que contienen aldolasa C y miR-26a se internalizan en neuronas, generando una disminución de la ramificación dendrítica”.

Para poner a prueba esta hipótesis, aislamos exosomas desde el sobrenadante de cultivos puros de astrocitos o de cultivos mixtos (neuronas y astrocitos) mediante centrifugaciones diferenciales. En esta fracción se analizó tamaño, densidad de flotación y composición proteica. Encontramos que aldolasa C está presente en exosomas obtenidos desde cultivos de astrocitos puros y que su contenido en estas vesículas incrementa en co-cultivo con neuronas, sugiriendo un rol en la comunicación astrocito/neurona. Además, encontramos que la enzima está presente en exosomas obtenidos desde líquido cefalorraquídeo (LCR) de rata y que su contenido en estas vesículas aumenta luego de un protocolo de estrés repetitivo por restricción de movimiento.

Para determinar el efecto de los exosomas portadores del aldolasa C sobre las neuronas, sobre-expresamos aldolasa C-GFP en astrocitos, pudiendo detectar la enzima recombinante en exosomas. Mediante Western blot e inmunocitofluorescencia observamos que estos exosomas se internalizan tanto en neuronas corticales como hipocampales, disminuyendo el largo y complejidad de los procesos dendríticos selectivamente en neuronas hipocampales, lo cual fue cuantificado mediante análisis de Sholl. Además, la sobre-expresión de

aldolasa C en astrocitos está asociada a un aumento en el contenido de miR-26a-5p, tanto en lisado celular como en exosomas y a una disminución en el contenido de miR-26a-3p en estos últimos. Análogamente, la transfección de un oligonucleótido con la misma secuencia de miR-26a-5p (mimic) recapitula parte de los efectos producidos por exosomas, sugiriendo que miR-26a-5p media los efectos morfológicos inducidos por estas vesículas. De forma coherente, los cambios morfológicos inducidos por exosomas son suprimidos previa inhibición de miR-26a-5p en neuronas.

Concluimos que los exosomas derivados de astrocitos son capaces de transferir aldolasa C a neuronas e inducir una disminución selectiva en la ramificación dendrítica de neuronas hipocampales que depende de miR-26a-5p. Este efecto selectivo reproduce lo descrito en estructuras hipocampales durante los trastornos del ánimo vinculados al estrés, sugiriendo que los exosomas derivados de astrocitos podrían ser nuevos mediadores de las adaptaciones a estas patologías.



## ABSTRACT

Exosomes are extracellular nanovesicles that could participate in inter-cellular signaling processes because of their unique cargo consisting of microRNAs (miRNAs), lipids and proteins. Astrocytes as well as neurons from the central nervous system (CNS) could use these vesicles as a novel way of communication.

Previous data from the lab show that extracellular levels of astrocyte-specific proteins, such as aldolase C and GFAP, increase in rats submitted to chronic stress. Part of this increase could be explained by an exosome-mediated release mechanism. Astrocytes are the most abundant glial cells in the CNS. They are key players in maintaining cerebral homeostasis by controlling extracellular levels of ions, neurotransmitters, trophic factors, neuronal metabolism as well as blood-brain barrier function. Nevertheless, the effects of astrocyte-derived exosomes on neuronal function remains mostly unexplored.

Aldolase C is a glycolytic enzyme able to bind nucleic acids with similar sequence to miRNA 26a (miR-26a). This microRNA is enriched in astrocytes and induces the down-regulation of several proteins related to synaptic activity maintenance and organization of the dendritic cytoarchitecture such as microtubule associated protein 2 (MAP2), brain derived neurotrophic factor (BDNF) or glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 $\beta$ ), among others.

Considering this background, our hypothesis is that “Astrocyte-derived exosomes containing aldolase C and miR-26a are internalized by neurons decreasing dendritic branching”.

To test this hypothesis, we isolated exosomes from pure astrocyte and mixed (astrocytes and neurons) cell culture supernatants by differential centrifugation. We characterized this vesicular fraction by size, flotation density, and proteic composition. We found aldolase C is present in exosomes obtained from pure astrocyte cell cultures and that its content increases in co-culture with neurons, suggesting it has a role in astrocyte/neuron communication. Besides, we found that this enzyme is present in exosomes isolated from the rat cerebrospinal fluid and that its content increases in rats submitted to a repetitive stress protocol by movement restriction.

In order to determine the effects of aldolase C containing exosomes on neurons, we over-expressed aldolase-C-GFP in astrocytes, which enabled us to detect recombinant protein in exosomes. We observed by Western Blot and immunocytofluorescence that these exosomes are internalized by hippocampal and cortical neurons, decreasing the length and complexity of dendritic processes selectively on hippocampal neurons and we quantified this effect by Sholl analysis. Aldolase C over-expression on astrocytes is associated to an increase of miR-26a-5p content in cellular lysates as well as in exosomes and a decrease of the miR-26a-3p content in this vesicle fraction. Similarly, transfection of an oligonucleotide with the same sequence of miR-26a-5p (mimic) recapitulates part

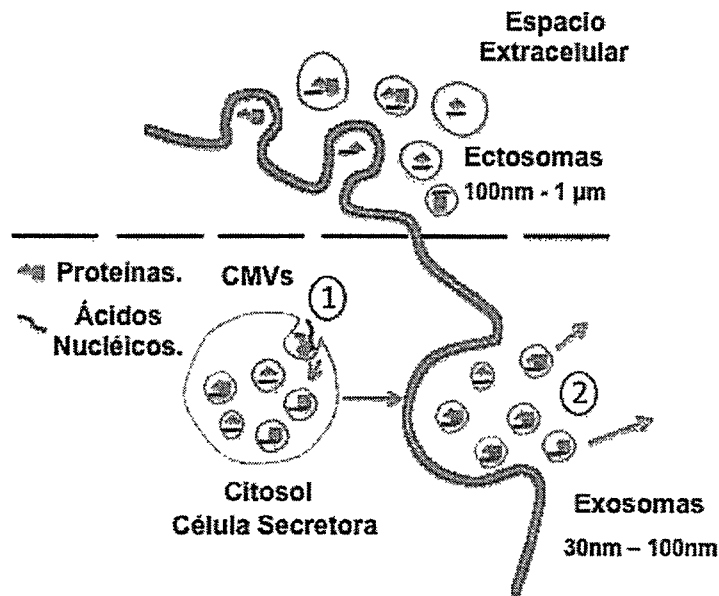
of these effects, suggesting that miR-26a-5p is a key factor in the morphological rearrangements induced by exosomes. Coherently, morphological changes induced by exosomes are suppressed by inhibiting miR-26a-5p on neurons.

We conclude that astrocyte-derived exosomes are able to transfer aldolase C to neurons, inducing a miR-26a-5p dependent selective decrease in dendritic branching of hippocampal neurons. This selective effect reproduces changes observed during stress related mood disorders in hippocampal structures, suggesting that astrocyte-derived exosomes could be new mediators of CNS adaptations in these pathologies.

## INTRODUCCIÓN

### I. Vesículas extracelulares.

La señalización intercelular en el sistema nervioso central (SNC), aparte de la neurotransmisión, incluye mecanismos paracrinos, de transmisión por volumen, que podrían explicar cambios globales en su funcionamiento. Esta señalización estaría mediada por la secreción de factores solubles y diferentes tipos de vesículas que, en su conjunto, se han denominado vesículas extracelulares (VEs). Entre estas últimas, encontramos a los cuerpos apoptóticos (tamaño cercano a 1  $\mu\text{m}$ ) y aquéllas que emergen directamente desde la membrana plasmática tales como: micropartículas, microvesículas y vesículas "shedding", las cuales tienen un rango de tamaño entre 100 nm y 1  $\mu\text{m}$  y han sido englobadas en un solo concepto como ectosomas (Cocucci y Meldolesi., 2015). Finalmente, encontramos a los exosomas, los cuales son nanovesículas de 30 a 100 nm que se originan desde la ruta endocítica (Colombo y cols., 2014) (figura 1). Todas las VEs tienen propiedades que les permiten mediar interacciones intercelulares con las células blanco. Entre ellas, los exosomas son las estructuras más estudiadas en cuanto a su capacidad de transferir intercelularmente ácidos ribonucleicos (RNAs), lípidos y proteínas que son funcionales.



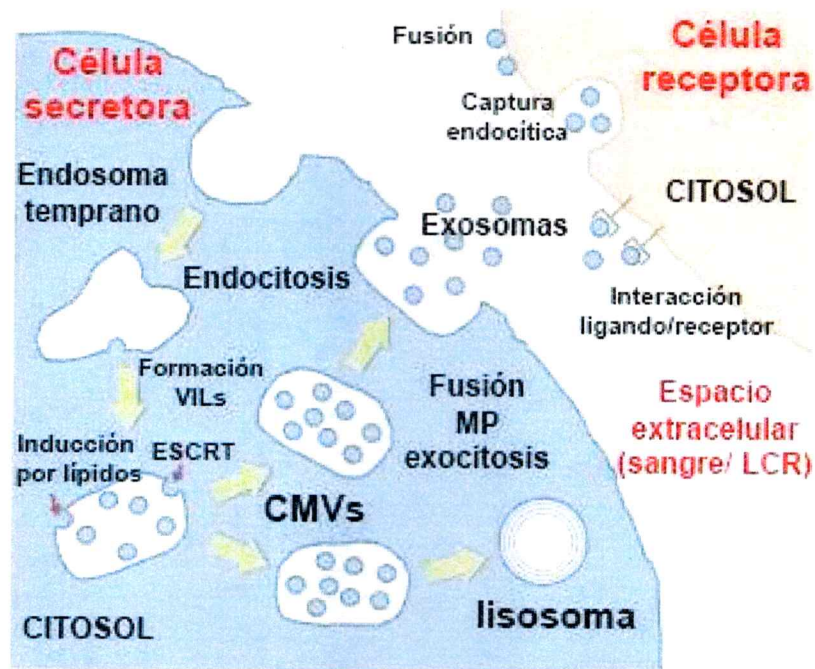
**Figura 1. Vesículas extracelulares.** Existen dos tipos de Vesículas extracelulares: Ectosomas, los cuales emergen desde la membrana plasmática (panel superior) y los exosomas que provienen de la ruta endocítica (panel inferior). Los cuerpos multivesiculares (CMVs) sufren una invaginación en su membrana que incorpora distintos componentes citosólicos en su lumen (1). Posteriormente, las vesículas intraluminales (VILs) son liberadas al espacio extracelular por fusión de los CMVs con la membrana plasmática donde se llamarán exosomas (2).

## II. Biogénesis de los exosomas.

El concepto de exosomas como vesículas extracelulares se estableció por primera vez con la descripción de la fusión del endosoma tardío o cuerpo multivesicular (CMV) con la membrana plasmática durante la maduración de los reticulocitos a glóbulos rojos sanguíneos, donde las vesículas intraluminales (VILs) son liberadas al espacio extracelular, denominándose exosomas (Harding y cols., 1983; Pan y Johnstone., 1983; Pan y cols., 1985). Las VILs liberadas se originan por invaginación de la membrana que recubre los CMVs de la ruta endocítica. Por lo tanto, la membrana de estas VILs se orienta en el

sentido que la membrana plasmática y circunscribe un lumen topológicamente equivalente al del citoplasma. Alternativamente, los CMVs pueden madurar hacia lisosoma para degradar su contenido. Los mecanismos que definen el destino de los CMVs hacia la ruta lisosomal o hacia la generación de exosomas, así como la selección del cargo específico dentro de vesículas intraluminales, son objeto de extensos estudios. (Hanson y Cashikar 2012; Théry y cols., 2002; Savina y cols., 2003; Colombo y cols., 2014). Se han descrito dos maneras principales de destinar componentes celulares a las VILs: los dependientes de ESCRT (complejo endosomal de selección requerido para transporte o endosomal sorting complex required for transport) y los mecanismos independientes de ESCRT. La maquinaria ESCRT se compone de cuatro complejos (ESCRT0, I, II y III) que secuestran proteínas transmembrana ubiquitinadas en un microdominio endosomal e inducen una invaginación que genera la formación de VILs. Los mecanismos de destinación de proteínas citosólicas solubles a exosomas han sido menos estudiados, por ejemplo, se ha descrito la destinación mediante microautofagia (Sahu y cols., 2011), o mediante interacción con proteínas transmembrana destinadas a exosomas (Chairoungdua y cols., 2010). Además, se ha propuesto que la destinación de proteínas citosólicas solubles ocurre por interacción con cualquiera de los componentes de la maquinaria ESCRT (Mageswaran y cols., 2014). En forma independiente de la maquinaria ESCRT, la formación de VILs puede estar mediada por ceramida (Trajkovic y cols., 2008; Kosaka y cols., 2013), o por interacción del cargo con CD63, tal como sucede con la proteína transmembrana PMEL (van Niel y cols., 2011). Otras proteínas

son seleccionadas mediante variaciones del modelo canónico dependiente de ESCRT, en donde participa Alix, una proteína accesoria a la maquinaria ESCRT (Baietti y cols., 2012; Hurley y Odorizzi., 2012). En relación a la incorporación de ácidos nucleicos en exosomas/VILs, algunos miRNAs son seleccionados por la presencia del motivo GGAG en la porción 3', uniéndose a proteínas sumoiladas tales como hnRNPA2B1 (Villarroya-Beltri y cols., 2013). Otra secuencia de destinación de miRNA a exosomas descrita es dependiente de la uridilación en el extremo 3' del ácido nucleico (Koppers-Lalic y cols., 2014).



**Figura 2. Biogénesis de exosomas.** Las vesículas intraluminales (VILs), posteriormente liberadas como exosomas, se originan por invaginación de la membrana que recubre el endosoma temprano, así como también el endosoma tardío/cuerpo multivesicular (CMV). Tanto la formación de VILs, como la destinación de cargo citosólico a su interior, dependen de la maquinaria del sistema endosomal de selección requerido para transporte (ESCRT), o bien, de la invaginación producida por cambios en la composición lipídica (ambos

mecanismos señalados con flechas rojas). Una población de los CMVs puede madurar hacia lisosoma para degradación del contenido, mientras que otra fusiona su membrana con la membrana plasmática (MP), liberando las VILs al espacio extracelular. Una vez fuera de la célula, los exosomas pueden interactuar de forma local o a mayor distancia, viajando a través de fluidos biológicos como la sangre o el líquido cefalorraquídeo (LCR). Fuera de la célula, los exosomas interactúan con células blanco por potencial fusión directa con la MP y fundamentalmente por mecanismos endocíticos (por ejemplo, macropinocitosis y fagocitosis). La internalización mediante la ruta endocítica permitiría que las membranas del exosoma se fusionen con las del endosoma de la célula blanco, con la consecuente transferencia de sus lípidos y contenido luminal (proteínas y RNAs) al citosol. La interacción de las proteínas de membrana del exosoma con las de la célula blanco, además pueden gatillar cascadas de señalización. Imagen y texto modificado de (Bátiz y cols., 2016).

Las principales etapas de la biogénesis de exosomas y su interacción con la célula blanco se resumen en la figura 2. En estos procesos, distintos elementos endosomales y citosólicos son incorporados a las VILs, generando una composición molecular compleja que se describirá a continuación y se resume en la figura 3.

### **III. Composición de los exosomas.**

#### **1. Proteínas:**

Los exosomas contienen proteínas relacionadas con varias funciones celulares tales como: transporte vesicular (Rab GTPasas, anexinas, flotilinas); proteínas de respuesta a estrés térmico (hsp/hsp 70 y 90); biogénesis de CMVs (Alix y TSG 101); algunas integrinas y tetraespaninas (CD63, CD9, CD81 y CD82) (Simons y Raposo, 2009; Taylor y cols., 2007), proteínas del citoesqueleto (actina, sintenina, moesina); proteínas de transducción de señales (quinasas); enzimas metabólicas (LDHA, GAPDH, PGK1, aldolasas, PKM), entre otras



(Chaput y Théry, 2010). Muchas proteínas consideradas como marcadores de exosomas son abundantes o están enriquecidas en los CMVs. Por ejemplo, HSP70 es una chaperona que participa en la incorporación de proteínas citosólicas solubles en las VILs (Sahu y cols., 2011). Otros marcadores corresponden a proteínas relacionadas con la biogénesis de los CMVs tales como la proteína interactora de muerte celular programada 6 (PDCD6IP), o Alix, y el gen de susceptibilidad tumoral 101 (TSG101). Además, proteínas transmembrana como CD63 (LAMP-3) (enriquecida en endosomas tardíos/CMVs) (Pols y Klumperman, 2009), CD81, el complejo mayor de histocompatibilidad II (MHCII) (Escola y cols., 1998), CD9 (Théry y cols., 2006) así como flotilina-1 y flotilina-2 son consideradas marcadores. A su vez, hay proteínas que se han descrito como ausentes en exosomas, tales como proteínas del retículo endoplásmico como Gp96 y calnexina; proteínas del aparato de Golgi como GM130 y de mitocondrias como citocromo C (Lötvall y cols., 2014; Théry y cols., 2006).

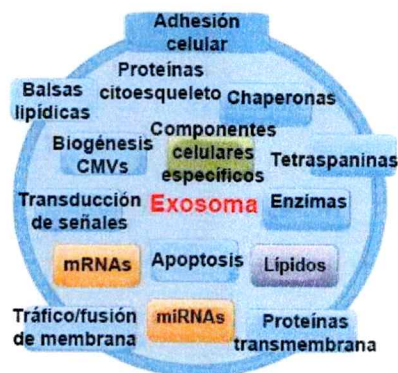
Es muy interesante notar que se ha descrito que los exosomas son capaces de transferir diversas proteínas a otras células y que además éstas pueden ser enzimas catalíticamente activas como PTEN (Putz y cols., 2012).

## **2. Lípidos:**

Las membranas de los exosomas tienen un perfil lipídico característico que las asemeja a la composición de las balsas lipídicas, pues contienen colesterol, ceramida, esfingomiélin y fosfatidilserina (Kowal y cols., 2014).

### 3. Ácidos nucleicos:

Los exosomas contienen ácidos nucleicos tales como fragmentos de ADN, ARN mensajero (mRNA), ARN ribosomal, ARN largos no codificantes (lncRNA) y ARNs pequeños no codificantes (sncRNAs) tales como microARNs (miRNAs). Se ha descrito que los exosomas tienen la interesante capacidad de transportar intercelularmente ARNs, tales como mRNAs y miRNAs, que son funcionales en la célula blanco (Valadi y cols., 2007; Pegtel y cols., 2010; Montecalvo y cols., 2012; Squadrito y cols., 2014).



**Figura 3. Composición molecular de los exosomas.** Estas vesículas contienen ácidos nucleicos (mRNAs y miRNAs); lípidos que asemejan la composición de las balsas lipídicas; proteínas citosólicas y transmembrana, relacionadas con diversas funciones celulares tales como: apoptosis, transducción de señales y biogénesis de cuerpos multivesiculares (CMVs), entre otras. Además contienen componentes característicos del tipo celular y estado fisiológico de las células desde las cuales se originan (componentes celulares específicos). Imagen modificada de (Bátiz y cols., 2016).

De todos los elementos que componen estas vesículas, los ácidos nucleicos, en especial los miRNAs, han cobrado gran relevancia producto de características que serán descritas en detalle a continuación.

#### **IV. Características y biogénesis de los miRNAs.**

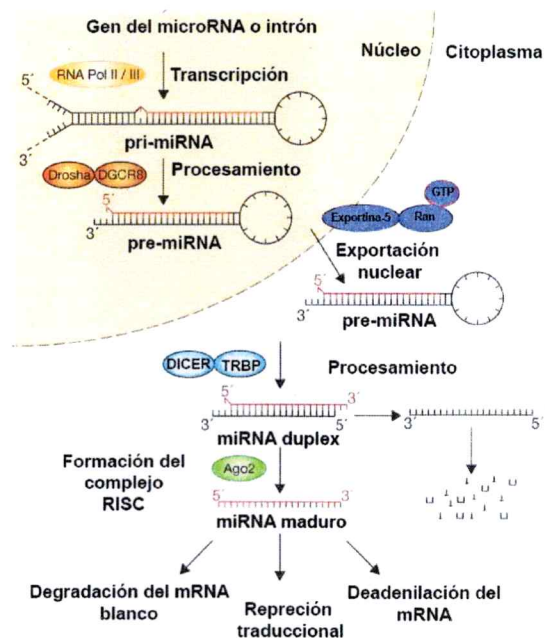
Los miRNAs son secuencias de ~ 22 nucleótidos no codificantes que inhiben o disminuyen los niveles de mRNAs uniéndose a su extremo 3' no traducido (3' UTR). Se piensa que son "reguladores maestros" de la expresión génica puesto que un solo miRNA puede regular la expresión del orden de 100 transcritos, pudiendo regular componentes de varias rutas funcionales de la célula (Papagiannakopoulos y cols., 2008).

Los miRNAs se originan por la codificación del transcrito primario (pri-miRNA) por parte de la ARN polimerasa II, luego este transcrito es procesado en el núcleo por el complejo molecular Drosha/DGCR8 (Lee y cols., 2003). Este complejo es capaz de cortar el pri-miRNA de modo de formar el "stem-loop" o bucle de unos 70 nucleótidos llamado pre-miRNA (Ha y Kim, 2014). El pre-miRNA interactúa con exportina 5 para transportarse hacia el citoplasma. Luego, en el citoplasma el pre-miRNA, es procesado por el complejo RNAsa Dicer, generando la doble hebra del miRNA maduro de aproximadamente 22 nucleótidos. Dentro de esta secuencia madura, entre los nucleótidos 2-7 desde el extremo 5' se encuentra la "secuencia semilla", la cual es la que define, según complementariedad, cuáles serán los blancos (Knight y Bass, 2001). Posteriormente, la forma madura es cargada en el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), donde posterior a la llegada de la proteína argonauta una hebra se degrada, mientras la otra se mantiene dentro del complejo. Esta hebra es llamada hebra guía o principal y contiene la secuencia semilla. La hebra

principal se define por el extremo termodinámicamente menos estable de la doble hebra madura (denominada 5p) (Tomari y cols., 2007). Frecuentemente, la hebra 5p es la más abundante en contraste con la hebra 3p. Posteriormente, la región semilla del miRNA es capaz de acoplarse a la región 3' UTR de ARNm e inhibir su traducción mediante dos mecanismos: (1) cuando la complementariedad del miRNA con el transcrito es incompleta, se reprime la traducción, reduciendo la capacidad de los ribosomas para reconocer el mRNA, o (2) cuando la complementariedad de la secuencia semilla es completa, se induce la degradación del transcrito blanco por la maquinaria RISC. Alternativamente, se puede inducir la deadenilación del ARNm (3).

Existen antecedentes que permiten suponer que dentro de todas las biomoléculas activas que pueden transportar los exosomas, los miRNAs son cargos esenciales en términos de las respuestas celulares que estas vesículas producen en las células blanco. En este sentido, Katsuda y Oshiya hicieron un compendio de resultados sobre los efectos terapéuticos de VEs derivadas de células madre mesenquimales (Katsuda y Ochiya, 2015), el cual muestra que la mayoría de los efectos reportados de estas vesículas se explican por la presencia de RNAs o miRNAs específicos a diferencia de lípidos y proteínas. Aunque no fue una búsqueda exhaustiva, este resultado puede reflejar el hecho de que los miRNAs son el cargo más relevante de los exosomas en términos de la capacidad de una sola molécula para modificar los niveles de varias proteínas/enzimas, afectando diversas funciones celulares (Ling y cols., 2013).

Uno de los resultados más sugerentes al respecto es el de Collino y cols., quien encontró que los efectos terapéuticos de exosomas derivados de células madres mesenquimales estromales, en un modelo de daño renal agudo, son abolidos cuando estas vesículas provienen de células depletadas de la proteína Drosha (lo cual produce una disminución generalizada de miRNAs) (Collino y cols., 2015). Es decir, a pesar de que la composición de los exosomas en términos de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos es compleja, los miRNAs podrían ser elementos claves para mediar los cambios funcionales producidos por su internalización en la célula receptora. Apoyando esta última idea, se ha reportado en varios trabajos que los efectos funcionales producidos por exosomas son recapitulados por un miRNA específico o inhibidos previa transfección con un bloqueador de su acción (Zhang y cols., 2015; Xin y cols., 2012).



**Figura 4. Biogénesis y función de los microRNAs (miRNAs).** Los miRNAs se originan por la codificación del transcrito primario (pri-miRNA) por parte de la RNA polimerasa II, posteriormente es procesado en el núcleo por el complejo molecular Drosha/DGCR8 que genera el pre-miRNA. El pre-miRNA interactúa con exportina 5 para transportarse hacia el citoplasma. En el citoplasma, el pre-miRNA, es procesado por el complejo RNAsa Dicer, generando la doble hebra del miRNA maduro. Posteriormente, la forma madura es cargada en el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC). Con la llegada de la proteína argonauta (Ago 2), una hebra se degrada, mientras la otra se mantiene dentro del complejo. Esta hebra es capaz de acoplarse a la región 3' UTR de un ARNm e inhibir su traducción mediante tres mecanismos: (1) cuando la complementariedad del miRNA con el transcrito es incompleta, reprime la traducción; (2) cuando la complementariedad de la secuencia semilla es completa, se induce la degradación del transcrito blanco por la maquinaria RISC; (3) Se induce la deadenilación del ARNm. Figura modificada de (Winter y cols., 2009).

Considerando que lípidos, proteínas y ácidos nucleicos pueden ser transferidos funcionalmente a una célula blanco mediante exosomas, a continuación revisaremos los mecanismos de internalización y algunas de las respuestas celulares que pueden desencadenar.

#### **V. Mecanismos de interacción de exosomas con células blanco.**

La composición de membrana y el cargo de los exosomas determinan el tipo de interacción que tendrán con otras células. En este sentido, los exosomas pueden hacer entrega de un cargo específico previa internalización mediados por la ruta endocítica. Por ejemplo: endocitosis mediada por clatrina (Tian y cols., 2014), fagocitosis (Feng y cols., 2010), internalización mediada por balsas lipídicas (Svensson y cols., 2013), macropinocitosis (Fitzner y cols., 2011) y también por fusión directa con la membrana plasmática, el cual sería un proceso minoritario y difícil de probar (Tian y cols., 2013; Montecalvo y cols., 2012). En

general, antes de que las vesículas entren a la célula se asocian con la membrana plasmática mediante interacción con proteínas transmembrana entre las cuales encontramos CD81 o CD9 (que además son marcadores de exosomas), integrinas  $\alpha$ v (CD51) y  $\beta$ 3 (CD61) y componentes de la matriz extracelular tales como los proteoglicanos heparan sulfato (HSPGs) y fosfatidilserina (Mulcahy y cols., 2014). Otro mecanismo de internalización recientemente descrito, depende de conexina 43, la cual facilitaría la interacción de la vesícula con la membrana plasmática, formando un hemicanal funcional (Soares y cols., 2015). Tras la incorporación de exosomas en los compartimentos endocíticos, un bajo pH favorecería la fusión de las membranas vesiculares con membranas celulares de modo tal que los lípidos exosomales llegarían a la membrana plasmática de forma indirecta, provenientes de la ruta endocítica (Parolini y cols., 2009).

Respecto de la transferencia de miRNAs funcionales a la célula diana, se ha visto que los CMVs tienden a estar en íntima asociación con el complejo silenciador inducido por ARN (RISC) (Gibbins y cols., 2009). Aunque aún no está completamente claro, es posible que los exosomas endocitados se comporten como VILs que se fusionan con la membrana de los CMVs (en un proceso de "fusión inversa" que permitiría a los miRNAs encontrar a la maquinaria RISC citosólica y ser funcionales (Montecalvo y cols., 2012)). Es probable que las enzimas transferidas funcionalmente por exosomas también sean entregadas de este modo.

Los exosomas pueden desencadenar respuestas celulares activando diversas rutas transduccionales por interacción de proteínas transmembrana. Por ejemplo, casi una década después de la primera descripción de los exosomas, Raposo y cols describieron que estas vesículas son portadoras del complejo mayor de histocompatibilidad II (MHCII) cargado con péptidos antigénicos y son capaces de facilitar la activación de los linfocitos T (Raposo y cols., 1996). También se ha descrito la transferencia de un complejo transmembrana de señalización de la vía Wnt que ocurre en las sinapsis neuromusculares de *Drosophila*, donde Wnt es transferida al espacio extracelular unida a la proteína transmembrana Evi presente en exosomas (Koles y cols., 2012). Otro tipo de interacción sucede con sinapsina-1 la cual se secretaría al medio extracelular desde el lumen de exosomas provenientes de astrocitos, afectando la arborización neurítica (Wang y cols., 2011).

La internalización de exosomas en diferentes tipos celulares puede ser selectiva: así, exosomas derivados de oligodendrocitos se incorporarían exclusivamente en microglías y no en otros tipos celulares del SNC (Fitzner y cols., 2011). En contraste, exosomas provenientes de neuronas que contienen la proteína priónica (PrP) se incorporan tanto en células neuronales como no-neuronales (Vella y cols., 2007). Los exosomas han sido vinculados con patologías del SNC relacionadas con el mal plegamiento de proteínas (Emmanouilidou y cols., 2010; Hu y cols., 2012; Gomes y cols., 2007). Sin





embargo, hasta el momento, existe escasa evidencia que vincule trastornos psiquiátricos con señalización mediada por exosomas (Tsilioni y cols., 2014).

## **VI. Participación de exosomas en la respuesta al estrés crónico.**

El estrés crónico es un factor precipitante de patologías psiquiátricas como la depresión y ha servido para modelar esta enfermedad en animales, ya que induce síntomas tipo depresivos como anhedonia, desesperanza y ansiedad (Kessler., 1997).

Entre los elementos que participan en el efecto deletéreo de estrés crónico sobre circuitos y estructuras neuronales se encuentran las hormonas CRH (hormona liberadora de corticotropina), adrenocorticotropina (ACTH) y corticosterona (cortisol en humanos), liberadas por el eje hipotálamo/hipófisis/glándula adrenal. Cada una de estas hormonas puede inducir cambios en el funcionamiento de circuitos neuronales, lo cual puede traer como consecuencia cambios conductuales (Brunson y cols., 2001; McEwen y cols., 2015). Uno de los factores más estudiados en este eje es la corticosterona. Esta hormona es un factor clave para mediar la respuesta adaptativa frente a estresores (McEwen., 2006), y sus receptores se expresan tanto en neuronas como astrocitos (Chatterjee y Sikdar., 2013; Horner y cols., 1990).

En el laboratorio de Neurociencias de la Universidad de Los Andes, hemos descrito que los niveles totales de la enzima de la vía glicolítica/gluconeogénica aldolasa C aumenta en el líquido cefalorraquídeo

(LCR) de ratas expuestas a estrés crónico (Ampuero y cols., 2015) y al tratamiento con el fármaco antidepresivo fluoxetina (Sandoval y cols., 2013). La ausencia de una secuencia de destinación al retículo en esta enzima sugiere un mecanismo de liberación no canónico, potencialmente mediado por exosomas.

## **VII. Características de aldolasa C.**

Aldolasa C es una proteína de 364 aminoácidos con un peso aproximado de 36 kDa que posee un alto grado de homología entre especies (Marsh y Lebherz, 1992). En el telencéfalo, las isoformas de aldolasa más abundantes son la A (específica de neuronas) y la C. La isoforma C está presente principalmente en astrocitos (Mukai y cols., 1991; Thompson y cols., 1982; Walther y cols., 1998), mientras que en el cerebelo se expresa en niveles altos en neuronas de Purkinje. Aldolasa C es una enzima que cataliza la aldohidrólisis de la fructosa 1,6- difosfato a dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y gliceraldehído-3-fosfato (GAP), una reacción de la glicólisis y gluconeogénesis.

Existe evidencia sobre la presencia de enzimas glicolíticas en exosomas y específicamente de aldolasas (Subra y cols., 2010). De hecho, las aldolasas pueden ingresar a las vesículas intraluminales de los cuerpos multivesiculares mediante un proceso denominado microautofagia endosomal (Sahu y cols., 2011), requiriendo de los componentes de la maquinaria del complejo ESCRT del tipo I y III. Considerando lo anterior, aldolasa C podría ser liberada por astrocitos al medio extracelular en exosomas para interactuar o internalizarse en neuronas

y tener un efecto funcional en ellas. Existe evidencia creciente de que los astrocitos pueden impactar notablemente la actividad neuronal de diferentes estructuras cerebrales. Esto por su abundante presencia en el SNC y por su íntima relación funcional y estructural con neuronas y el resto de los tipos celulares del parénquima cerebral, como se describirá a continuación.

### **VIII. Relevancia de la interacción astrocito-neurona en el SNC.**

Los astrocitos comprenden cerca del 50% del volumen del cerebro de un mamífero. Se ha postulado que funcionan como un sincicio que conecta prácticamente todos los tipos celulares del SNC tales como: neuronas, oligodendrocitos, microglías, y células de la vasculatura. Esta última está cubierta en un 99% por procesos de astrocitos, dando origen a la barrera hematoencefálica. Además, mediante uniones en juntura, los astrocitos son capaces de formar entre sí redes de cientos de células, abarcando amplias zonas del tejido cerebral (Aguilhon y cols., 2008; Kuga y cols., 2011). Las sinapsis están en íntimo contacto con procesos de astrocitos, formando una estructura regulada y dinámica que puede comprender hasta un 40% de las sinapsis cerebrales (Wang y Bordey, 2008; Perea y cols., 2009). Así, los astrocitos liberan diversos factores que modulan el funcionamiento sináptico de manera dependiente de la actividad neuronal, (Pirttimaki y cols., 2011). Tal interrelación funcional entre la terminación presináptica, postsináptica, y el astrocito, se conoce como sinapsis tripartita (Perea y cols., 2014), permitiendo la remoción de neurotransmisores e iones como potasio, liberados desde sinapsis activas, para a su vez proveerlas

tanto de soporte metabólico como neurotrófico (Sibille y cols., 2014). De forma coherente con la dependencia de la actividad neuronal en la secreción de exosomas y otras moléculas desde astrocitos, se ha descrito que la modulación de la actividad sináptica por parte del astrocito depende íntimamente de la ruta tanto exocítica como endocítica (endosoma tardío/lisosoma) del astrocito (Guček y cols., 2012).

Habitualmente, los astrocitos se identifican porque expresan la proteína fibrilar glial ácida (GFAP), la cual es un componente de los filamentos intermedios del citoesqueleto. También se utilizan otros marcadores como la proteína S100 $\beta$  o una isoforma de aldehído deshidrogenasa específica (Aldh1L1) (Cahoy y cols., 2008). Las proteínas de membrana distintivas de astrocitos centrales son la conexina 43 y aquaporina 4 (Freitas-Andrade y Naus., 2016).

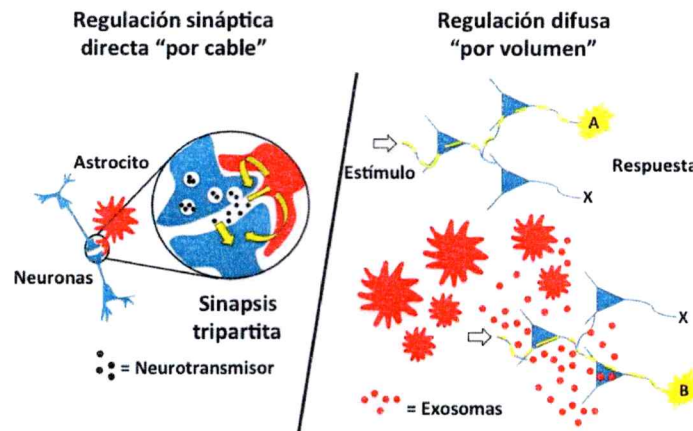
Existe evidencia creciente sobre el rol de los astrocitos en diversas patologías del sistema nervioso. Por ejemplo, se ha encontrado que los astrocitos de personas con esclerosis lateral amiotrófica familiar o esporádica tienen propiedades tóxicas, en co-cultivo, sobre las motoneuronas de personas sin la enfermedad (Haidet-Phillips y cols., 2011). Es decir, la evidencia actual apunta a entender las patologías del sistema nervioso como un todo armónico con los tipos celulares que lo conforman y no sólo como una alteración autónoma del funcionamiento neuronal. En otra aproximación experimental *in vivo*, se ha visto que la inhibición farmacológica del funcionamiento de los astrocitos de la corteza medial prefrontal se relaciona con trastornos cognitivos (Lima y cols., 2014). De

manera análoga, moléculas relacionadas a la conectividad entre astrocitos como las conexinas (que permiten el flujo de sustancias formando redes funcionales), así como la morfología y expresión de marcadores de activación, tales como GFAP, se han visto alteradas en cerebros de pacientes con trastorno depresivo mayor (Rajkowska y Stockmeier., 2013; Medina y cols., 2016). Los astrocitos parecen estar en una condición estratégica para responder a diferentes disfunciones neuronales y sinápticas. Es así como se ha especulado sobre su posible rol en la fisiopatología de los trastornos del ánimo, a la vez que se ha propuesto que estas células serían un nuevo blanco terapéutico para ellos (Rajkowska y Stockmeier, 2013; Miguel-Hidalgo y cols., 2000).

En el sistema nervioso periférico está bien establecido que otras células gliales, como las células de Schwann, transfieren de manera no convencional proteínas a neuronas (Court y cols., 2008; Lopez-Verrilli y Court, 2012). Ésta y otras evidencias en distintos tipos celulares del sistema nervioso han conducido a proponer que los tipos celulares del SNC se comunican mediante exosomas (Budnik y cols., 2016). En este contexto, la señalización entre astrocitos y neuronas mediada por exosomas podría constituir un nuevo mecanismo de comunicación que ha sido escasamente evaluado hasta ahora. Hasta donde sabemos, tan sólo dos trabajos previos han descrito efectos de exosomas de astrocitos en neuronas. Solamente uno de ellos muestra transferencia funcional de componentes como la proteína priónica PrP, la cual induce neuroprotección en neuronas sometidas a hipoxia (Guitart y cols., 2016). El segundo trabajo,

muestra que los exosomas de astrocitos son capaces de liberar sinapsina-1 bajo un medio alto en potasio y que esa liberación se relacionaría con un aumento neurítico, aunque no muestran que ese efecto sea mediado directamente por exosomas (Wang y cols., 2011). Así, el estudio del efecto que tendrían los exosomas portadores de aldolasa C en la función neuronal puede constituir una de las descripciones pioneras del campo. La relevancia funcional de la transferencia de diferentes componentes astrocitarios a neuronas en términos de la organización de la conectividad neuronal, hasta ahora, no ha sido explorada.

Tal como se esquematiza en la figura 5, nosotros pensamos que la transferencia de moléculas desde astrocitos a neuronas mediada por exosomas, puede tener consecuencias relevantes en la función neuronal, afectando tanto su morfología, como sus propiedades sinápticas. Así, los exosomas derivados de astrocitos regularían, tanto la comunicación directa entre dos neuronas (regulación por cable) como a varias neuronas de una red funcional. Este último proceso forma parte de la llamada regulación “por volumen” del sistema nervioso (Agnati y cols., 2010), la cual puede tener consecuencias relevantes sobre la respuesta de una red neural a un determinado estímulo. Frente a este contexto general, nos preguntamos cuál es la función de una enzima glicolítica como aldolasa C, expresada selectivamente en astrocitos, al ser transferida a neuronas mediante exosomas.



**Figura 5. Participación de los astrocitos en la regulación de la función neuronal.** En el panel izquierdo se esquematiza la sinapsis tripartita, formada por un terminal axónico presináptico, una espina dendrítica post-sináptica y un proceso de astrocito (en rojo). La liberación de neurotransmisores como el glutamato es sensada por el astrocito, que a su vez libera sustancias que modulan localmente la actividad sináptica (flecha amarilla), los exosomas podrían ser parte de aquellos elementos. Este tipo de regulación directa entre dos neuronas se denomina “por cable”. En el panel de la derecha se muestra cómo los astrocitos, mediante la liberación difusa de exosomas, podrían modular la respuesta de una red neuronal. Frente a un mismo estímulo, la respuesta de la red pasa de ser de tipo A, a una respuesta tipo B. Esta regulación mediante señales difusibles que afectan a varias neuronas constituye un tipo de regulación denominada “por volumen”. Los exosomas de astrocitos serían un nuevo tipo interactores, tanto de la transmisión “por volumen”, como “por cable”, en el SNC.

### IX. Potenciales efectos de los exosomas portadores de aldolasa C en la función neuronal.

El metabolismo neuronal es predominantemente aeróbico por lo que es poco probable que la transferencia de aldolasa C en exosomas juegue un papel en el metabolismo de neuronas (Barros., 2013). Alternativamente, la enzima cumple funciones denominadas secundarias o “moonlight” (Cañete-Soler y cols., 2005; Jeffery., 2003). Así, la enzima interactúa con proteínas del citoesqueleto

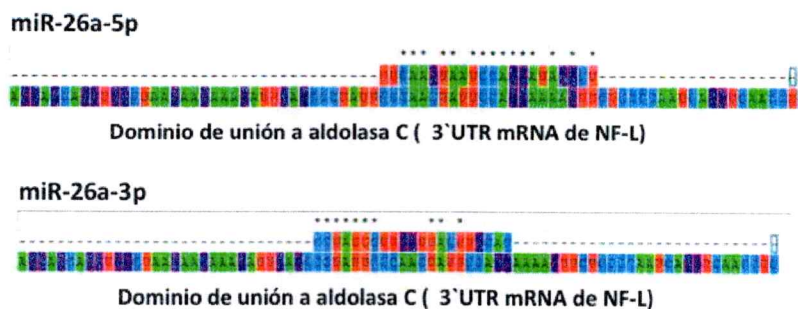
(Kao y cols., 1999; Kusakabe y cols., 1994; Volker y Knull., 1997), modifica la distribución de vesículas acídicas dentro de la célula (Merkulova y cols., 2011) y regula los niveles de calcio intracelulares por su capacidad de unión a inositol trifosfato IP<sub>3</sub> (Baron y cols., 1995, 1998). Aldolasa C también es capaz de activar la vía Wnt canónica al formar un complejo con Axina (Caspí y cols., 2014).

Además, aldolasa C es una nucleasa dependiente de Zinc que degrada los transcritos que codifican para la cadena liviana de neurofilamentos (NF-L), un componente del citoesqueleto neuronal (Stefanizzi y Cañete-Soler., 2007). De hecho, la sola expresión de aldolasa C en neuronas resulta en una importante disminución en el contenido proteico de NF-L (Stefanizzi y Cañete-Soler., 2007). Para degradar este transcrito, aldolasa C debe unirse a una secuencia de 68 nucleótidos presentes en el mRNA de NF-L. Existe así la interesante posibilidad de que aldolasa C interactúe también con secuencias de miRNAs. En este sentido, la secuencia de 68 nucleótidos es altamente homóloga a la secuencia de varios miRNAs potencialmente implicados en la fisiopatología de la depresión (Hansen y Obrietan., 2013). Además, es interesante notar que varias proteínas metabólicas han sido descritas como proteínas de unión a RNAs (Castello y cols., 2015).

Existe evidencia para suponer que ciertas proteínas de unión a RNA (RBPs) unen el sitio 3'UTR de un transcrito, compitiendo con aquellos miRNAs que se asocian a esa secuencia. Así, proteínas como Hur unen directamente miR-21 para impedir su acción y potenciar la expresión de sus blancos de



degradación (Loffreda y cols., 2015; Xu y cols., 2005; Poria y cols., 2016). Bajo este razonamiento, suponemos que aldolasa C puede unir miRNAs que guarden identidad con su secuencia de interacción en el 3'UTR del mRNA de NF-L. Mediante el programa TargetScan ([www.targetscan.org](http://www.targetscan.org)) encontramos que esta secuencia comparte identidad con varios miRNAs. Entre ellos, encontramos a miRNA 26a (miR-26a), el cual ha sido identificado en exosomas (Skog y cols., 2008) y además se expresa con predominancia en astrocitos (Mor y cols., 2011). Tanto la hebra 3p como la 5p de miR-26a tienen complementariedad con la secuencia del mRNA de NF-L (68 nucleótidos), sin embargo, la hebra 5p es más afín con casi un 70% de identidad (figura 6). De esta manera, aldolasa C y miR-26a-5p formarían un complejo que podría transferirse a neuronas mediante exosomas. En las siguientes secciones de esta tesis, analizaremos blancos validados y potencialmente regulados por la hebra 5p de miR-26a porque, en general, éstas son las más abundantes en la célula, en oposición a la hebra 3p “passenger” que se considera minoritaria y menos relevante para los efectos de los miRNAs (Huang y cols., 2014).



**Figura 6. Identidad de la secuencia de las hebras de miR-26a con la secuencia nucleotídica que une aldolasa C.** Se muestra la secuencia descrita para la unión de aldolasa C en la secuencia no traducida del transcrito que codifica para la cadena liviana del neurofilamento (3' UTR mRNA NF-L, 68 nucleótidos) de rata y de las hebras maduras de miR-26a (5p y 3p) de rata. Se indican mediante asteriscos las bases idénticas en las secuencias del miRNA.

#### **X. Características de miR-26a.**

La familia de miR-26 está compuesta por tres miembros: miR-26a-1, miR-26a-2 y miR-26b. Los tres tipos de hebras comparten identidad en su secuencia semilla, y por lo tanto, tienen blancos similares. La familia de miR-26 en humanos se distribuye en tres cromosomas distintos 2, 3 y 12, los cuales están ubicados en una región intrónica del gen que codifica para la fosfatasa del dominio carboxi-terminal del polipeptido A de la RNA polimerasa II (CTDSP) (Wang y cols., 2016).

La regulación que induciría un modelo de estrés por restricción de movimiento en el contenido de los exosomas derivados de astrocitos del SNC, mueve nuestra atención a aquellos blancos de miR-26a-5p que puedan tener relevancia en los cambios adaptativos inducidos por el estrés. En este sentido, se sabe que en animales sometidos a ciertos modelos de estrés, disminuye la complejidad estructural de neuronas en núcleos cerebrales como el hipocampo, generándose una profunda reorganización en su citoarquitectura (McEwen y cols., 2016; McEwen., 1999).

Entre los blancos neuronales de miR-26a-5p se encuentran: la proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2, componente del citoesqueleto dendrítico) (Derksen y cols., 2007); el canal de calcio CACNA1C (Cav 1.2), que ha sido

relacionado con trastornos psiquiátricos (Bhat y cols., 2012; Perrier y cols., 2011) y la subunidad alfa 1C del canal de calcio activado por voltaje tipo L (VDCCL)(Shi y cols., 2009). Otro transcrito regulado por miR-26a-5p, y comprobado experimentalmente, es el que codifica para la proteína glicógeno sintasa quinasa 3 beta (GSK3 $\beta$ ) (Suh y cols., 2012), la cual mediante su fosforilación regula el ensamblaje de diferentes componentes del citoesqueleto neuronal, entre ellos, Tau y MAP1B (Scales y cols., 2009). Además, GSK3 $\beta$  está implicada en la activación de la vía canónica de señalización Wnt, la cual ha sido vinculada al adecuado desarrollo sináptico en vertebrados (Ciani y Salinas., 2005; Park y Shen., 2012). En cuanto a las neurotrofinas, el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) es un blanco comprobado, cuya señalización está alterada en ciertos tipos de trastornos del ánimo (Caputo y cols., 2011), siendo el aumento en su expresión en estructuras cerebrales específicas un requerimiento para la efectividad de terapias antidepresivas (Castrén., 2004). Adicionalmente, miR-26a-5p podría incidir en la sobrevivencia neuronal, aumentando la señalización de la vía ERK mediante la disminución de los niveles de PTEN (Huse y cols., 2009; Li y Sun., 2013).

Es interesante mencionar que varios de los blancos descritos para miR-26a-5p en neuronas tendrían un efecto sobre la citoarquitectura neuronal. En la tabla 1, se resumen algunos de los blancos comprobados de miR-26a-5p que podrían incidir en la morfología neuronal.

| Proteína     | Referencia               | Efectos descritos en neuronas                                                                                                                                    | Directo |
|--------------|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| PTEN         | (Li y Sun., 2013)        | Promoción del crecimiento axonal en neuronas corticales en cultivo.                                                                                              | X       |
|              | (Suh y cols., 2012)      | Reducción de apoptosis y aumento en crecimiento neurítico de neuronas del ganglio de la raíz dorsal en modelo de lesión mediado por bupivacaína.                 | X       |
| GSK3 $\beta$ | (Jiang y cols., 2015)    | Aumento de regeneración axonal en modelo de lesión mecánica de nervio ciático ( <i>in vivo</i> ) y en cultivo de ganglios de la raíz dorsal ( <i>in vitro</i> ). | X       |
| WNT5a        | (Zhao y cols., 2014)     | Inhibición directa del transcrito de Wnt5a en células de cáncer de próstata, ayudando a la supresión del desarrollo tumoral.                                     | X       |
|              | (Horigane y cols., 2016) | Wnt5a promueve el crecimiento axonal en cultivo de neuronas corticales, pero no modifica la arborización dendrítica.                                             |         |
| MAP2         | (Kye y cols., 2007)      | Inhibición de miR-26a produce un aumento en los niveles de MAP2 en neuronas hipocampales en cultivo.                                                             | X       |
|              | (Caceres y cols., 1992)  | Disminución de MAP2 reduce el número de neuritas menores en macroneuronas cerebelares en cultivo.                                                                |         |
| BDNF         | (Caputo y cols., 2011)   | Inducción de degradación del transcrito de BDNF.                                                                                                                 | X       |
|              | (Labelle y Leclerc 2000) | BDNF favorece el crecimiento del compartimento axonal y neuritas menores en neuronas hipocampales en cultivo.                                                    |         |

**Tabla 1. Proteínas reguladas por miR-26a-5p y su efecto en la morfología neuronal.** Se describe la proteína regulada, la referencia y el efecto observado. Efecto mediado directamente por miR-26a se denota con una cruz (X).

En resumen, nosotros pensamos que los exosomas derivados de astrocitos que contienen aldolasa C podrían transferirse a neuronas junto a miR-26a, induciendo cambios en la citoarquitectura que podrían ser relevantes para la conectividad y función neuronal. Hasta el momento, no existe evidencia en la literatura que muestre el efecto del contenido de microRNAs de los exosomas derivados de astrocitos sobre la función neuronal. Considerando que aldolasa C podría unir a miR-26a-5p, el cual disminuye el contenido de proteínas relevantes para la mantención de la morfología dendrítica, tales como BDNF y/o MAP2, postulamos la siguiente hipótesis:

## **HIPÓTESIS**

Los exosomas de astrocitos que contienen aldolasa C y miR-26a-5p, se internalizan en neuronas, generando una disminución en la ramificación dendrítica.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la participación de los exosomas de astrocitos, que contienen aldolasa C y miR-26a-5p, en la disminución de la ramificación dendrítica.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Caracterizar los exosomas portadores de aldolasa C obtenidos desde el medio condicionado de astrocitos.
2. Evaluar la internalización de exosomas portadores de aldolasa C y miR-26a-5p en neuronas.
3. Cuantificar los cambios morfológicos inducidos por exosomas de astrocitos que sobre-expresan aldolasa C en neuronas y determinar la participación miR-26a-5p en este efecto.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### I. Modelo animal.

Para realizar cultivos de astrocitos, se utilizaron embriones en el día 21 de gestación retirados por cesárea a partir de ratas preñadas de entre 300 y 400 g. Para electroporación *in utero*, se utilizaron ratas hembra de 18 días de gestación. Los animales utilizados para ser sometidos a estrés repetitivo fueron ratas Sprague-Dawley machos de 220 a 250 g al inicio del protocolo. Los procedimientos que involucraron animales y su cuidado fueron realizados en acuerdo con las normas del comité de bioética de la Universidad de los Andes y la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio de Conicyt.

### II. Protocolo de estrés en ratas.

Una semana antes de iniciar el protocolo, los animales fueron separados en grupos de 3 a 5 ratas. Durante los experimentos, las ratas se mantuvieron en sus jaulas de origen. Se utilizó un protocolo de estrés por restricción de movimiento que consiste en colocar al animal en una jaula hecha de alambre de 18 cm x6 cm x6 cm por 2 horas diarias durante 10 días consecutivos (Ampuero y cols., 2015). Esta jaula limita los movimientos del animal. Las ratas se estresaron siempre en el mismo horario entre 11:00 AM y 13:00 PM. Luego, los animales fueron utilizados para inmunohistofluorescencia (IHF) o extracción de líquido cefalorraquídeo como se describe en (Ampuero y cols., 2013).

### **III. Extracción de Líquido cefalorraquídeo (LCR).**

Las ratas fueron anestesiadas mediante inyección intraperitoneal de una mezcla de ketamina 50 mg/kg y xilacina 5 mg/kg y se dispusieron en el aparato estereotáxico. Enseguida, se extrajo LCR mediante una aguja de calibre 27 que fue insertada a 5 mm de profundidad en la zona central de la cisterna magna. Se extrajeron entre 50 a 100  $\mu$ l de LCR cristalino, que luego de colectado se centrifugó brevemente 2 veces para recoger el sobrenadante sin restos de glóbulos rojos (Vio y cols., 2008).

### **IV. Electroporación *in utero*.**

Usamos la metodología descrita por (Rosen y cols., 2007). Se electroporaron fetos de ratas preñadas de 18 días de gestación (en etapa gliogénica) para alcanzar la corteza cerebral. Las ratas fueron anestesiadas con Ketamina 100 mg/kg y Xilacina 2 mg/kg. Posteriormente, la rata se recostó en una toalla de papel secante limpia ubicada sobre un manto calefactor con temperatura constante de 37°C. Los ojos del animal fueron humectados constantemente mediante gotas de gel lubricante ocular comercial (Novotears). Los fetos fueron expuestos mediante una incisión de 4 cm sobre la línea alba de la capa muscular. Una vez expuestos, los fetos fueron constantemente humectados con una solución de suero fisiológico (NaCl al 0,9% p/v en agua destilada) más antibióticos a una dilución 1:200 de penicilina 10,000 U/ml y estreptomycin 10,000  $\mu$ g/ml a una temperatura de 37° C. Previamente, se preparó un capilar de vidrio con 100-150  $\mu$ m de radio interior, modificado



mediante un estirador de pipetas P97 (Sutter Instruments). Luego, se introdujo en el capilar 25  $\mu$ l de una solución con la siguiente composición: 0,75  $\mu$ g/ $\mu$ l Colorante Fast Green (Sigma); 1  $\mu$ g/ $\mu$ l plasmidio pCAG\_PBase y 1  $\mu$ g/ $\mu$ l plasmidio pPBCAG\_aldolasa C-GFP/ pPBCAG\_ GFP, todo diluído en agua bi-destilada. En seguida, se inyectó 1-2  $\mu$ l de esta solución en el ventrículo lateral de los embriones mediante una pico-bomba de presión (PV830, World Precision Instruments). Luego, se dió un pulso eléctrico de 60-70 Volts mediante un capacitor de 500  $\mu$ F y 250 Volts, previamente cargado con una fuente de poder. La descarga se dio a través de placas de aleación de cobre (1 x 0.5 cm), dispuestas sobre cerebro con el electrodo positivo enfrentando el hemisferio izquierdo. Los fetos se dejaron crecer hasta el día 21 de gestación para efectuar cultivos de astrocitos puros a partir del hemisferio electroporado.

## **V. Plasmidios.**

Para construir el plasmidio pPBCAG\_aldolasa C-GFP, el gen de rata de aldolasa C fue clonado en el plasmidio pPBCAG\_eGFP, usando los sitios de restricción EcoRI y AgeI, ambos constructos fueron gentilmente donados por LoTurco y diseñados para usar el sistema de transgénesis piggyBac, como se describe en (Chen y LoTurco, 2012). Ambos constructos están bajo el promotor CAG el cual fue diseñado conectando la secuencia "enhancer" de citomegalovirus CMV-IE con un promotor modificado del gen que codifica para la  $\beta$ -actina de pollo, tal como se describe en (Hitoshi y cols., 1991). El plasmidio que codifica para la transposasa del sistema de inserción piggyBac

(pCAG\_PBase) está también bajo el control del promotor CAG, el cual también fue gentilmente donado por LoTurco.

## **VI. Cultivos de astrocitos puros.**

Los cultivos primarios de astrocitos puros se realizaron según un procedimiento establecido (Ramírez y cols., 2005). Brevemente, embriones de 21 días de gestación fueron retirados por cesárea y sacrificados mediante decapitación. El cerebro se extrajo y se retiraron las meninges, para luego disectar cuidadosamente el telencéfalo (corteza incluido el hipocampo). La muestra se lavó cuatro veces con solución Hank's (NaCl 137 mM; KCl 5,4 mM; Mg SO<sub>4</sub> 0,8 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,8 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4 mM; CaCl<sub>2</sub> 1,5 mM; NaHCO<sub>3</sub> 4,2 mM; glucosa 5,5 mM; ajustada a pH 7,4 con NaOH), y se trituró exhaustivamente con bisturí. El tejido se incubó a 37° C con tripsina 1x (Sigma) durante 10 minutos, en seguida, se agregaron 2 ml de medio de cultivo de astrocitos (DMEM/F12 Ham (Sigma) a pH=7,2; estreptomycin 100 µg/ml y penicilina 100 U/ml más suero fetal bovino al 10% v/v). Luego las células fueron resuspendidas vigorosamente y disociadas mediante 12 pasadas a través de una pipeta Pasteur de vidrio. Esta suspensión de células se sembró sobre 10 ml de medio de cultivo de astrocitos en una botella de cultivo cuya superficie es de 75 cm<sup>2</sup>. En los días 4 y 8 *in vitro* (DIV) se efectuó un lavado con solución Hank's, seguida de un cambio total de medio. Luego de 15 DIV, los astrocitos fueron re-plaqueados para disminuir la presencia de microglías. Para ello, las botellas se agitaron durante 30 minutos, y posteriormente, las células se incubaron con tripsina 0,1x (Sigma) durante 1

minuto a 37°C para eliminar microglías adheridas. En seguida, se efectuaron dos lavados con solución Hank's y se incubó con tripsina 1x (Sigma) por 8 minutos a 37°C para despegar todos los astrocitos de la botella. Esta suspensión se llevó a 5 ml de medio de astrocitos y se dejó en una placa de 100 mm por 15 minutos para retirar microglías remanentes por adhesión diferencial. Posteriormente, esta suspensión de células enriquecida en astrocitos se sembró en placas de 100 mm hasta alcanzar confluencia adecuada para los experimentos.

### **VII. Cultivos neuronales puros y mixtos.**

Ratas preñadas de 18 días de gestación (E18) fueron anestesiadas con éter etílico antes de la intervención. Se extrajeron los cuernos uterinos para retirar los embriones. Los embriones se depositaron en una cápsula Petri con solución Hank's estéril y fría (en hielo). A partir de este momento, todo el procedimiento se realiza en hielo. Los embriones se decapitaron y se depositó la cabeza del embrión en una nueva placa con Hank's fresco. Se extrajo el cerebro y separó el hipocampo y corteza cerebral, descartando los cerebros que hayan sufrido daño durante el proceso de extracción. Los tejidos se lavaron 10 veces con solución Hank's estéril y sometidos a disgregación enzimática, incubando por 15 minutos con tripsina 1x (Sigma). Las células viables fueron contadas en una cámara de Neubauer con el método de azul de tripán y sembradas en una cantidad de 20.000-40.000 células en pocillos de 35 mm (según se indique). Para prevenir el crecimiento de células no-neuronales se agregó 2  $\mu$ M arabinósido de citosina (AraC) (Sigma C1768) 24 horas después de sembrar. Para obtener cultivos

mixtos, no se agregó AraC. Las neuronas fueron mantenidas en medio Neurobasal (Life Technologies) y suplementadas con B27 (Life Technologies), 2 mM glutamina (Life Technologies) más estreptomycinina 100 µg/ml y penicilina 100 U/ml. El medio se cambió cada tres días, reemplazando el 30% del total.

#### **VIII. Co-cultivo de neuronas y astrocitos electroporados.**

A cultivos neuronales puros de 3 DIV (20.000 células) se les agregó 5.000 células desde cultivos de astrocitos puros de 15 DIV provenientes de animales electroporados con el plasmidio correspondiente. Los experimentos de estimulación y análisis de imágenes de los co-cultivos fueron realizados 72 horas posterior a la siembra de astrocitos. Las células fueron mantenidas en medio Neurobasal (Life Technologies) suplementado con B27 (Life Technologies), glutamina 2 mM (Life Technologies), estreptomycinina 100 µg/ml y penicilina 100 U/ml. El medio se cambió, reemplazando el 30% del total cada tres días.

#### **IX. Estimulación de cultivos puros de astrocitos y co-cultivos con corticosterona.**

Se preparó una solución stock de corticosterona 100 mM (Sigma # C2505) diluída en dimetilsulfóxido (DMSO) como vehículo. La dilución de trabajo se alcanzó diluyendo con el medio de cultivo apropiado hasta estimular las células a una concentración final de 1 µM. Para estimular las placas control se agregó DMSO diluído a la misma concentración.

### **1. Estimulación de cultivos puros de astrocitos:**

A cultivos de astrocitos obtenidos de cerebros electroporados con aldolasa C-GFP, con 70%-90% de confluencia, se les cambió totalmente el medio condicionado por medio de astrocitos libre de exosomas y, 48 horas después, se agregó corticosterona para, luego de 24 horas, coleccionar los medios y aislar exosomas.

### **2. Estimulación de co-cultivos:**

Co-cultivos, desarrollados como se describió anteriormente, fueron estimulados con corticosterona a la concentración indicada. Una hora después, las células se fijaron y analizaron por inmunocitofluorescencia.

### **X. Transfección de mimic e inhibidor de miRNA.**

Cultivos de neuronas hipocampales de 3 DIV (30.000 células), fueron transfectados con los siguientes oligos: inhibidor de miR-26a-5p (Ambion, # 4464084) (antago); control negativo del inhibidor de miRNA (Ambion, # AM17012) (scrambled antago); mimic de miR-26a-5p (Ambion, # 4464066) (mimic); control negativo de mimic de miRNA (Ambion, # 4464058) (scrambled mimic) a una concentración final de 25 nM. Los oligos se incorporaron en las neuronas mediante magnetofección (Magnetofection™, Neuromag), según las instrucciones del fabricante. Brevemente, 10 pmol de mimic o antago se mezclaron con 1 µl de reactivo del fabricante disueltos en 100 µl de MEM sin suero a pH= 7,4, la solución se agitó suavemente y se mantuvo a 37° C durante

20 minutos. Esta mezcla fue incorporada lentamente en pocillos de 12 mm (sembrados con 30.000 células) en 300 µl de MEM sin suero a pH 7,4 (desde los cuales previamente se retiró y guardó el medio condicionado). Posteriormente, las células se dispusieron sobre una placa magnética por 20 minutos después de los cuales el medio MEM fue reemplazado completamente por el medio Neurobasal condicionado almacenado previamente. Cuando se estimuló con exosomas, éstos fueron agregados 2-3 horas después de realizada la transfección.

#### **XI. Obtención/purificación de exosomas.**

Cuando los astrocitos alcanzaron 70% a 90% de confluencia, el medio de cultivo fue reemplazado por medio libre de exosomas por 72 horas o tiempos menores para realizar la curva temporal. Posteriormente, el medio se colectó y se realizaron centrifugaciones sucesivas: 30 minutos a 2.000 xg para eliminar células; 40 minutos a 10.000 xg durante para eliminar debris celular y microvesículas; 2 horas a 100.000 xg para obtener los exosomas en el precipitado. Éste fue resuspendido en PBS a pH= 7,4, para finalmente centrifugar nuevamente 2 horas a 100.000 xg. El pellet resultante contiene exosomas (Théry y cols., 2006) y se usó para los experimentos. Se usó el mismo protocolo para aislar exosomas desde cultivos mixtos. La concentración de proteínas de la muestra se midió usando el método del ácido Bicincónico (BCA), según el sistema comercial (Pierce). Como control positivo de las proteínas exosomales

detectadas por WB se usó lisado de astrocitos. Los exosomas para experimentos de estimulación fueron almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  en HEPES 50 mM a  $\text{pH}=7,4$ .

## **XII. Ensayo de protección a proteasas.**

25  $\mu\text{g}$  de exosomas obtenidos desde cultivos mixtos a una concentración de 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  por condición, fueron incubados por 1 hora a  $40^{\circ}\text{C}$  en las siguientes condiciones: (1) exosomas; (2) exosomas más tripsina al 0,001% p/v; (3) exosomas más tritón X-100 al 0,2 % p/v y tripsina al 0,001% p/v; (4) exosomas más tripsina al 0,001% p/v y de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 20 mM como inhibidor de proteasas. La reacción se detuvo agregando PMSF a una concentración final de 20 mM para cada condición. Las muestras se utilizaron para detección de proteínas por Western Blot.

## **XIII. Análisis de vesículas por microscopía electrónica.**

Los exosomas fueron fijados con 2% PFA, puestos en una grilla recubierta de carbono y visualizadas por microscopio electrónico como está descrito previamente (Théry y cols., 2006).

## **XIV. Análisis de seguimiento de nano-partículas.**

El tamaño de las vesículas fue determinado usando nanoSight LM10 system (NanoSight) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Muestras de 0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  exosomas fueron diluidas en PBS 1:3 antes del análisis.

#### **XV. Experimento de flotación de exosomas en gradiente de densidad continuo de sacarosa.**

Para verificar la densidad a la cual flotan los exosomas, se realizó un gradiente continuo de sacarosa en agua deuterada. Se cargaron, en el fondo de un tubo de ultracentrífuga de 13 ml, 300-400 µg de exosomas resuspendidos en 1 ml de sacarosa 2,5 M con tampón HEPES 50 mM a pH= 7,2 en agua deuterada a 4°C. Sobre esta mezcla se realizó un gradiente lineal continuo de sacarosa hecho a partir de dos soluciones de sacarosa: 2 M y 0,5 M. La gradiente se centrifugó 17 horas a 200.000 xg y se detuvo con el modo de frenado libre de la ultracentrífuga. Luego, se colectaron fracciones de 1 ml desde la parte superior de la gradiente. Cada una de estas fracciones se suspendió en 12 ml de HEPES 50 mM a pH=7,4 para luego centrifugar a 200.000 xg por 2 horas con el objeto de colectar los exosomas en el precipitado. El precipitado de cada uno de estos tubos fue resuspendido en 30 µl de tampón de carga en condiciones denaturantes y cargado en su totalidad en un gel de acrilamida al 12% p/v con SDS para analizar por Western Blot.

#### **XVI. Estimulación de neuronas con exosomas aislados desde astrocitos.**

Los exosomas, disueltos en HEPES 50 mM a pH=7,4, fueron aislados desde cultivos de astrocitos preparados desde cerebros electroporados con los constructos pPBCAG-GFP, pPBCAG-Aldolasa C-GFP, y pGFAP-PBasa, según se indique. Posteriormente, fueron resuspendidos en medio Neurobasal y agregados a cultivos primarios de 3 DIV de neuronas hipocampales y corticales



(30.000 células) a una concentración final entre 1 ng/ $\mu$ l -10 ng/ $\mu$ l (según se indique), en un volumen final de 400  $\mu$ l de medio condicionado. 72 horas después, las células fueron fijadas y teñidas con los anticuerpos correspondientes. Cuando se indica, las neuronas fueron transfectadas con el inhibidor de miR-26a-5p 2-3 horas antes de la estimulación con exosomas.

### **XVII. Análisis morfológico de Neuronas.**

Se analizó por el método de Sholl todas las neuritas positivas para MAP2, contabilizando el número de veces que los procesos intersectan círculos concéntricos separados por 3  $\mu$ m entre sí (Sholl, 1953). Este análisis se efectuó con la ayuda del programa ImageJ, usando el plugin Sholl analysis, desarrollado por (Ferreira y cols., 2014). Los parámetros morfológicos analizados fueron los siguientes: "ramificación total", el cual corresponde a la sumatoria de todas las intersecciones que cruzan todas las circunferencias que describen los radios inscritos en una neurona; "radio máximo", el cual corresponde al radio de mayor tamaño que alcanzan los procesos de una neurona; "ramificación máxima", que corresponde al mayor número de intersecciones que alcanza una neurona para un radio dado; "ramificaciones primarias", corresponde al número de intersecciones que alcanza una neurona en el primer radio y "valor crítico", el cual corresponde al tamaño del radio que es intersectado por el máximo número de neuritas. La adquisición de imágenes, el trazado y la aplicación del análisis de Sholl, fueron hechas en ciego para evitar sesgos. Se analizaron 30-50 neuronas por condición desde 2-3 cubreobjetos para obtener un solo valor promedio por

fecha de cultivo independiente. Cuando se estimuló con exosomas, la preparación de cada fecha provino de cultivos de astrocitos originados desde distintos cerebros.

Mediante tinción contra  $\beta$ III-tubulina, que marca tanto dendritas como axones, se analizó el parámetro "neurita más larga" que corresponde al proceso más largo de la neurona. Para ello se utilizó la función de medición por trazo libre del programa ImageJ, segmentando la neurita más larga manualmente. Se analizaron 30-50 neuronas por condición desde 2-3 cubreobjetos para obtener un solo valor promedio por fecha de cultivo (cultivo independiente).

#### **XVIII. Inmunocitoquímica.**

Las neuronas y astrocitos fueron fijadas con 100% p/v metanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos, permeabilizadas con Triton X-100 al 0,2 % p/v en PBS por 5 minutos y bloqueadas con BSA al 10% p/v en PBS por 10 minutos. Luego las células fueron incubadas durante 12 horas a  $4^{\circ}\text{C}$  con el anticuerpo primario y dilución correspondiente en BSA al 10% p/v en PBS. Luego se lavaron 3 veces con PBS (5 minutos cada lavado) e incubadas a temperatura ambiente durante 1 hora con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a una sonda fluorescente. Posteriormente, las células se lavaron 3 veces (5 minutos) e incubaron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 300 nM en PBS por 3 minutos. En seguida, las células se lavaron 3 veces con PBS para remover el PBS con dos lavados de agua destilada. Finalmente, las células se montaron con medio de montaje DAKO. Para teñir las células con diferentes anticuerpos, se realizó

inmunocitoquímica convencional. La fijación se realizó por 10 minutos con metanol 100% p/v a -20°C, la permeabilización con Tritón X-100 al 0,2 % p/v en PBS y bloqueo con BSA al 10% p/v en PBS pH= 7,4. En seguida, se incubó el anticuerpo primario correspondiente disuelto en BSA al 10% p/v en PBS pH= 7,4 por a lo menos 4 horas a temperatura ambiente, o bien, durante toda la noche a 4° C en las concentraciones que se indican. El anticuerpo secundario fluorescente correspondiente fue agregado en una concentración de 1:1000, durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego, las células fueron lavadas 3 veces con PBS y cuando se indica, incubadas 5 minutos con una solución de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) 300 nM en PBS a pH= 7,4. Finalmente, las tinciones fueron sumergidas en agua bidestilada para luego ser dispuestas sobre un portaobjetos de vidrio con medio de montaje DAKO. Las muestras fueron analizadas en un microscopio de epifluorescencia NIKON TE-2000U provisto de una cámara DS-2MBWc (2.0 megapíxeles monocromática CCD). Objetivos: 60x, 40x y 20x.

#### **XIX. Análisis de colocalización en cultivos de astrocitos.**

Los análisis de colocalización se realizaron usando Imaris 7.2.3 software (Bitplane, Zurich, Switzerland) calculando los coeficientes de correlación de Pearson y Manders. Los umbrales de intensidad de cada canal se ajustaron automáticamente con este mismo programa, usando un algoritmo desarrollado por Costes (Adler y cols., 2008; Costes y cols., 2004). Las imágenes fueron

deconvolucionadas (cuando se indique) mediante deconvolución ciega *con el programa AutoQuant X 2.2.*

## **XX. Western Blot.**

Las proteínas se separaron por geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Para geles lineales de acrilamida al 12% p/v, la electroforesis se realizó a 70 Volts durante 45 minutos, aumentando luego a 100 Volts. Para las muestras obtenidas a partir de gradientes de densidad, se cargaron volúmenes iguales por carril.

La transferencia de proteínas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa (BioRad) se realizó con una corriente constante de 350 mA durante 90 minutos. Luego de la transferencia, las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% p/v en PBS por 1 hora a temperatura ambiente y con agitación constante. Las membranas se lavaron 3 veces por 5 minutos con PBS para retirar el exceso de leche y se incubaron toda la noche con agitación constante con los distintos anticuerpos a utilizar diluidos en PBS. Al siguiente día, las membranas se lavaron 3 veces con Tween en PBS por 10 minutos y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente al anticuerpo primario, en una dilución 1/5.000 de Tween al 0,1% p/v en PBS y leche descremada al 5% p/v, por 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron 2 veces con Tween al 0,1% p/v en PBS por 10 minutos y una vez con PBS. Para finalizar, las membranas se incuban 1 minuto con el reactivo quimioluminiscente (ECL, Amersham Bioscience) y luego se ponen en contacto con la película (Hyperfilm ECL,

Amersham Bioscience). Los Western Blots se cuantificaron por densitometría utilizando el programa Photoshop 7.0 (Adobe).

#### **XXI. Perfusión de los animales.**

Las ratas se sacrificaron bajo anestesia con inyección intraperitoneal de ketamina 50 mg/kg y xilacina 5 mg/kg para luego perfundirlas intraventricularmente con 50 ml de PBS pH= 7,4 a 37° C seguido de fijación con 300 ml de paraformaldehído (PFA) al 4% p/v en PBS a 4° C. Después de la perfusión, los cerebros fueron removidos inmediatamente, y post-fijados durante 2 horas con PFA fresco al 4% p/v en PBS. Los cerebros fijados fueron deshidratados secuencialmente en sacarosa al 15% y 30% p/v, para luego cortarlos en el crióstato a -20° C en secciones de 30 µm.

#### **XXII. Inmunohistoquímica.**

Los cortes fueron bloqueados (PBS pH= 7,4 + Tritón X-100 al 0,25% p/v + suero de caballo al 5% p/v+ BSA al 5% p/v) por 1 hora. Luego se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes diluïdos en la solución de anticuerpos (PBS pH= 7,4 + Tritón X-100 al 0,25% p/v + BSA al 1% p/v+ suero de caballo al 1% p/v) durante 48 horas a 4° C. Posteriormente, los cortes se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios acoplados a sondas fluorescentes. Finalmente, los cortes se montaron en los porta-objetos con medio de montaje (DAKO).



Las fotos de las tinciones de tejidos hipocampales de las ratas fueron adquiridas mediante un microscopio confocal de escaneo por láser (Leica TCS SP2 AOBS; Leica Microsystems, Mannheim, Germany) equipado con un objetivo de inmersión en aceite Fluotar 20X con una apertura numérica de 0.7, y Fluotar 63x de inmersión en aceite con una apertura numérica de 1.4. Las imágenes fueron deconvolucionadas (cuando se indique) mediante deconvolución ciega con el programa *AutoQuant X 2.2*.

### **XXIII. Inmunoprecipitación (IP) de aldolasa C.**

Los cultivos de astrocitos puros fueron solubilizados desde placas de 100 mm a 70-90% de confluencia con 1 ml de tampón de solubilización/lisis RIPA (SDS al 0,1% p/v, NP40 al 0,5 % p/v, Deoxicolato de Sodio al 0,5 % p/v, Tris-HCl 10 mM a pH= 7,5, EDTA 1mM, NaCl 150 mM, todo disuelto en H<sub>2</sub>O ultrapura milli-Q (Millipore)) durante 16 horas a 4° C en agitación constante más un coctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas (Roche # 11836170001, una tableta por cada 10 mL de tampón). Posteriormente, la muestra fue centrifugada a 30.000 xg durante 30 minutos a 4°C para descartar la muestra no solubilizada. En paralelo, se lavan 400 µl de esferas de proteína G-Sefarosa (Sigma) para la muestra y el control negativo (suero preinmune). Las esferas se lavaron 2 veces con 1 ml de tampón RIPA, y se centrifugó a 500 xg por 5 minutos a 4°C, el sobrenadante se descartó después de cada centrifugación. Finalmente, las esferas se bloquearon con 1 ml de PBS pH= 7,4 y BSA al 1% p/v por 12 horas a 4° C con agitación constante. Al día siguiente, las esferas se lavaron 2 veces con 1 ml de tampón

RIPA y luego se agregó 200  $\mu$ l de tampón de solubilización y se homogenizó suavemente (tubo B). De la suspensión del tubo B, se tomó 100  $\mu$ l de esferas y se incubaron en agitación constante con la muestra solubilizada por 2 horas (prelavado de la muestra). Posteriormente, esta mezcla fue centrifugada a 500 g y se descartó el precipitado. Al sobrenadante anterior, se agregó 5  $\mu$ g del anticuerpo primario correspondiente por 48 horas a 4° C con agitación constante (tubo A). Como control negativo se utilizaron 5  $\mu$ g de suero pre-inmune de la especie correspondiente. Posteriormente, se agregó el contenido del tubo B (~100  $\mu$ l) sobre el tubo A y se incubó por 2 horas a 4° C con agitación constante. La mezcla se centrifugó y se descartó el sobrenadante. El pellet, que contiene las esferas de sefarosa, se lavó 3 veces con 1 ml de tampón de solubilización/lisis. Finalmente, las esferas se resuspendieron en 60  $\mu$ l de tampón de carga, se hirvieron por 5 minutos y se sometió a WB. Alternativamente, parte del pellet final se almacenó a -20° C para extraer RNAs.

#### **XXIV. Extracción de RNAs.**

Las muestras se procesaron con el kit comercial miRNeasy Plus Mini Kit de Qiagen, según instrucciones del fabricante. Brevemente, se añadió QIAzol Lysis Reagent a la muestra y se agitó por un minuto en Vortex. El material de partida fue cuantificado como cantidad total de proteínas y se utilizaron las siguientes cantidades: 400  $\mu$ g para células en cultivo, 10  $\mu$ g para exosomas y para el pellet de la IP se usó el total de la muestra. Posteriormente, se agregó cloroformo y se agitó vigorosamente por 14 segundos, luego la muestra se incubó

a temperatura ambiente durante 2 o 3 minutos. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 10.000 xg por 5 minutos a 4°C para separar la fase acuosa de la orgánica. La fase acuosa se colectó y centrifugó en una columna Rneasy Mini, a 8.000 xg por 15 segundos a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregó el tampón RE (miRNeasy Plus Mini Kit) (este paso se hizo por duplicado) a una columna y se centrifugó 15 segundos a 8.000 xg con tampón, descartando el eluído. Finalmente, la columna se transfirió a un nuevo tubo colector y los RNAs se eluyeron por centrifugación a 8.000 xg por 1 minuto con agua libre de RNAsas. Las muestras se cuantificaron usando un espectrofotómetro de microvolumen NanoDrop 2000. La concentración se determinó con la absorbancia a 260 nm (A260), mientras que la pureza fue estimada midiendo la razón A260/A280.

#### **XXV. RT-PCR cuantitativo de miRNAs.**

La La transcripción reversa para obtener los cDNAs se realizó con el kit comercial TaqMan® MicroRNA Assays, según instrucciones del fabricante. Brevemente, a partir de la extracción total de RNAs con el método anteriormente descrito se añadió 100 ng totales de cada tipo de muestra y condición a los partidores específicos de miR-26a-5p y miR-26a-3p, más el tampón de mezcla provisto por el kit comercial para la retro-transcripción. El tampón de mezcla se compone de los nucleósidos a 100mM; transcriptasa reversa 50U/μl; tampón RT e Inhibidor de RNAsas 20U/μl. La reacción se llevó a cabo en un termo ciclador con el siguiente programa de temperatura: 30 minutos a 16°C; 30 minutos a 42°C



y 5 minutos a 85°C. La reacción se detuvo a 4°C para efectuar las reacciones de PCR en tiempo real.

El PCR en tiempo real se realizó según instrucciones del fabricante. Brevemente, se mezclaron los partidores Taqman específicos junto con los productos de la transcripción reversa anteriormente descritos, más una solución compuesta de agua libre de RNAasas y Taqman universal master mix II. Todos estos componentes fueron sometidos al siguiente programa de ciclos de temperatura: un paso inicial para activar la DNA polimerasa por 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95° C y 60 segundos a 60° C para la amplificación. Una vez finalizados los ciclos de amplificación, el valor umbral se determinó en forma manual. Este mismo valor se utilizó para todas las reacciones de una misma condición experimental con el fin de obtener los valores de ciclo umbral (Ct). Los valores entre condiciones fueron normalizados con el contenido relativo del componente de la maquinaria de corte y empalme U6. Las veces de cambio de un miRNA para cada condición fueron calculadas usando el método del doble delta Ct como está descrito (Livak y Schmittgen, 2001). Por ejemplo:

La expresión (E) del miRNA de interés se define como  $E = 2^{-Ct(\text{miRNA})}$ .

Luego esta expresión (E) fue normalizada por la expresión de un gen de expresión constitutiva como U6.

$$2^{-Ct(\text{miRNA})} / 2^{-Ct(\text{U6})} = 2^{-(Ct \text{ mi RNA} - Ct \text{ U6})} = 2^{-\Delta Ct}$$

Finalmente, las veces de cambio, comparando diferentes condiciones (ejemplo, GFP y aldolasa C-GFP), se calcularon mediante la siguiente ecuación:

$$2^{-\Delta Ct \text{ (miRNA condición 1)}} / 2^{-\Delta Ct \text{ (miRNA condición 2)}} = 2^{-\Delta \Delta Ct}$$

Los valores de Ct mayores o iguales a 35 fueron considerados como no detectados.

#### **XXVI. Anticuerpos primarios.**

MAP2 A/B (MAB5622, Millipore, Santiago, RM, Chile) (WB 1:1000, IF 1:1000); MAP2 A/B (MAB378, Millipore, Santiago, RM, Chile) (WB 1:1000, IF 1:1000); Aldolasa C (sc-12065, Santa Cruz Biotechnology, Santiago, RM, Chile) (WB 1:1000, IHC 1:100, IP 1:40); Aldolasa C (Ab87122, Abcam, Santiago, RM, Chile) (IF 1:500); Aldolasa C (PA5-27659, Thermo, Santiago, RM, Chile) (WB 1:1000); TSG101 (Ab83, Abcam, Santiago, RM, Chile) (WB 1:1000); Aldolasa C anticuerpo monoclonal gentilmente donado por Dr. Richard Hawkes (University of Calgary, Alberta, Canada) (WB 1:1000); Flotilina-1 (610821, BD Transduction laboratories, Santiago, Chile) (WB:1:1000); CD63 (sc-15363, Santa Cruz Biotechnology, Santiago, Chile) (WB 1:1000, IF 1:500); GM130 (Ab 1299, Abcam, Santiago, RM, Chile) (WB 1:1000); GFAP (Mab C 2032-28B, US Biological, Santiago, RM, Chile) (WB 1:1000, IF 1:1000); GFP (Ab6673, Abcam, Santiago, RM, Chile) (WB 1:1000); GFP (MAB3580, MILLIPORE, Santiago, RM, Chile) (IF 1:1000); Alix (sc-53540, Santa Cruz Biotechnology, Santiago, RM, Chile) (WB 1:1000, IHC 1:500);  $\beta$ -actina (A5441, Sigma, Santiago, RM, Chile) (WB 1:1000);

NF-L (2835, Cell signaling, Santiago, RM, Chile) (WB 1:1000);  $\beta$ III-Tubulina (T2200, Sigma, Santiago, RM, Chile) (WB 1:4000; IF 1:1000).

#### **XXVII. Anticuerpos secundarios.**

Alexa Fluor® 488 conjugado con burro anti-ratón IgG (H+L) (a21202) (IF 1:1000); Alexa Fluor® 555 conjugado con cabra anti-conejo IgG (H+L) (a21429) (1:1000); Alexa Fluor® 488 conjugado con cabra anti-conejo IgG (H+L) (a11034) (IF 1:1000). Anti-ratón conjugado a peroxidasa de rábano (# 31430, Thermo, Santiago, RM, Chile) (WB 1: 5000) ; anti-conejo conjugado a peroxidasa de rábano (# 31460, Thermo, Santiago, RM, Chile) (WB 1: 5000) (WB 1: 5000); Anti-cabra conjugado a peroxidasa de rábano (# 31402, Thermo, Santiago, RM, Chile) (WB 1: 5000) .

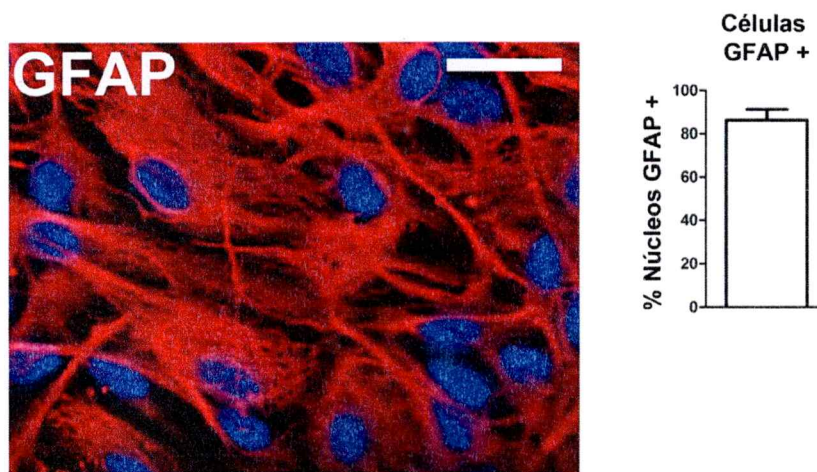
#### **XXVIII. Análisis estadístico.**

Las diferencias entre dos grupos se determinaron usando la prueba t de Student o Mann-Whitney U de dos colas, según se indique. Las diferencias entre dos o más grupos se evaluaron con ANOVA de una vía seguida por la prueba post-hoc de Tukey. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### I. Aldolasa C está presente en exosomas de astrocitos.

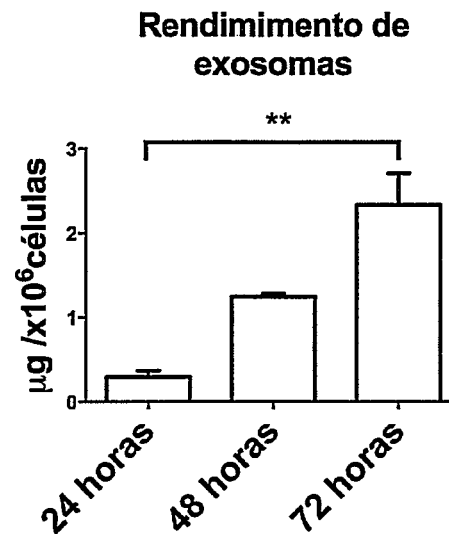
En primer lugar, se desarrollaron cultivos de astrocitos puros para cuantificar el número de células positivas para GFAP respecto del total de núcleos marcados por 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). El porcentaje de células positivas fue de  $86,2 \pm 9\%$  (figura 7). En estos cultivos, no fue posible detectar células positivas para MAP2 de manera que la presencia de neuronas se considera nula.



**Figura 7. Porcentaje de células GFAP positivas en cultivos de astrocitos puros.** Izquierda, inmunocitofluorescencia contra el marcador de astrocitos GFAP (en rojo) y en azul los núcleos celulares (DAPI). Derecha, cuantificación del porcentaje de células positivas para GFAP respecto del total de núcleos positivos para DAPI. Se indica el promedio  $\pm$  error estándar de tres experimentos independientes (N= 3). Barra= 50  $\mu$ m.

A partir del sobrenadante (medio condicionado) de cultivos de astrocitos de 2-3 semanas *in vitro* se obtuvieron exosomas según la metodología descrita.

Al procesar el medio condicionado a distintos tiempos de incubación, se obtuvo el siguiente rendimiento:  $0,21 \pm 0,01$   $\mu\text{g}$  de proteínas por millón de células luego de 24 horas;  $1,24 \pm 0,07$   $\mu\text{g}$  de proteínas por millón de células luego de 48 horas;  $2,33 \pm 0,99$   $\mu\text{g}$  por millón de células luego de 72 horas (figura 8). Por lo tanto, los exosomas serán aislados con rendimiento óptimo desde medio condicionado con 72 horas de incubación.



**Figura 8. Rendimiento en la producción de exosomas.** Se calculó el rendimiento como cantidad de proteínas totales en la fracción exosomal por millón de células en cultivos de astrocitos puros a las 24, 48 ó 72 horas de incubación con medio previamente depletado de exosomas. Para cada tiempo se indica el promedio  $\pm$  error estándar de 4 cultivos independientes (N= 4). \*\*  $p < 0,01$ . ANOVA no pareado de una vía y prueba post-hoc de Tukey.

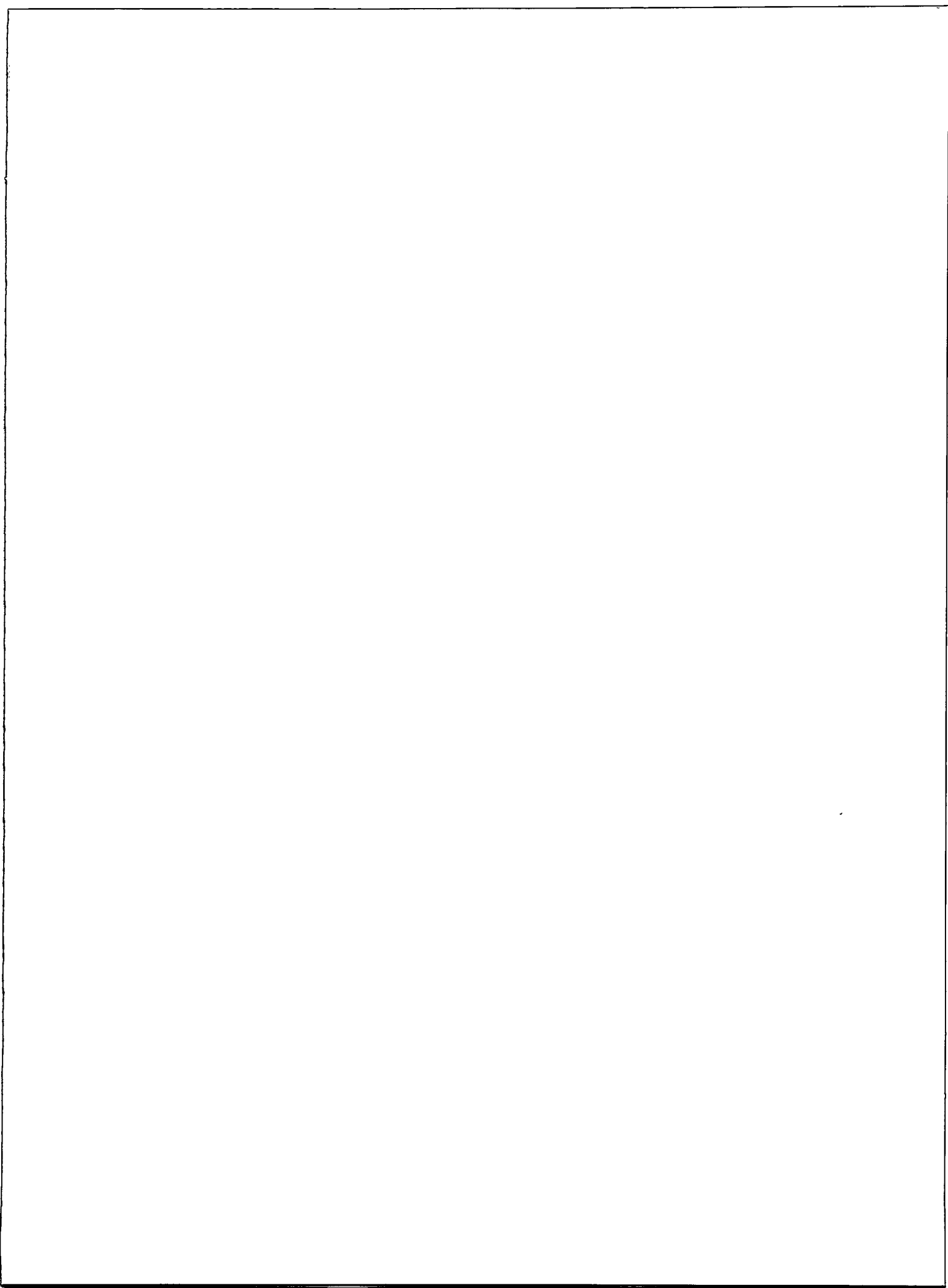
Caracterizamos los exosomas de astrocitos puros y de cultivos corticales mixtos ( $24,7 \pm 4$  % astrocitos y  $69,8 \pm 4$  % neuronas, N=3). Ambas fracciones de vesículas contienen marcadores clásicos de exosomas tales como TSG101, Alix, CD63 y ausencia del marcador negativo GM130 (aparato de Golgi) (figura 9 A).

Inesperadamente, el contenido de aldolasa C y GFAP es varias veces mayor en exosomas de cultivos mixtos que de astrocitos puros ( $11 \pm 2$  veces para aldolasa C  $p = 0,0013$  y  $4,6 \pm 0,6$  veces para GFAP  $p = 0,0001$ , figura 9 A). Ambos valores fueron normalizados contra CD63. Utilizamos este normalizador puesto que, cargando la misma cantidad de proteínas, el cambio de CD63 entre ambas muestras no fue significativo ( $1,2 \pm 0,3$  veces  $p = 0,367$ ). Para determinar el origen de aldolasa C en estas vesículas, se compararon los niveles de expresión en cultivos de astrocitos puros, cultivos mixtos y de neuronas puras (en presencia de AraC). Encontramos que los niveles de aldolasa C son  $32 \pm 4$  veces mayores en astrocitos puros ( $p = 0,001$  vs. neuronas puras) y  $10 \pm 4$  veces mayores en cultivos mixtos ( $p = 0,07$  vs. neuronas puras,  $p = 0,01$  vs. astrocitos puros, figura 9 B). Así, el contenido total de aldolasa C es progresivamente menor a medida que disminuye la cantidad de glías en los cultivos. Esto mostraría que, tal como está descrito *in vivo*, aldolasa C también se expresa selectivamente en astrocitos *in vitro*, aunque no podemos descartar que en co-cultivo exista una inducción de su expresión en neuronas. Sin embargo, el aumento concomitante de GFAP (una proteína exclusivamente glial) en la fracción exosomal podría reflejar una mayor activación/maduración astrocitaria inducida por la presencia de neuronas, explicando también el aumento de aldolasa C (Daniels y Brown, 2001). Con todo, podemos decir que la destinación de aldolasa C a exosomas aumenta en co-cultivo, sugiriendo un rol en la comunicación astrocito/neurona mediado por estas vesículas.

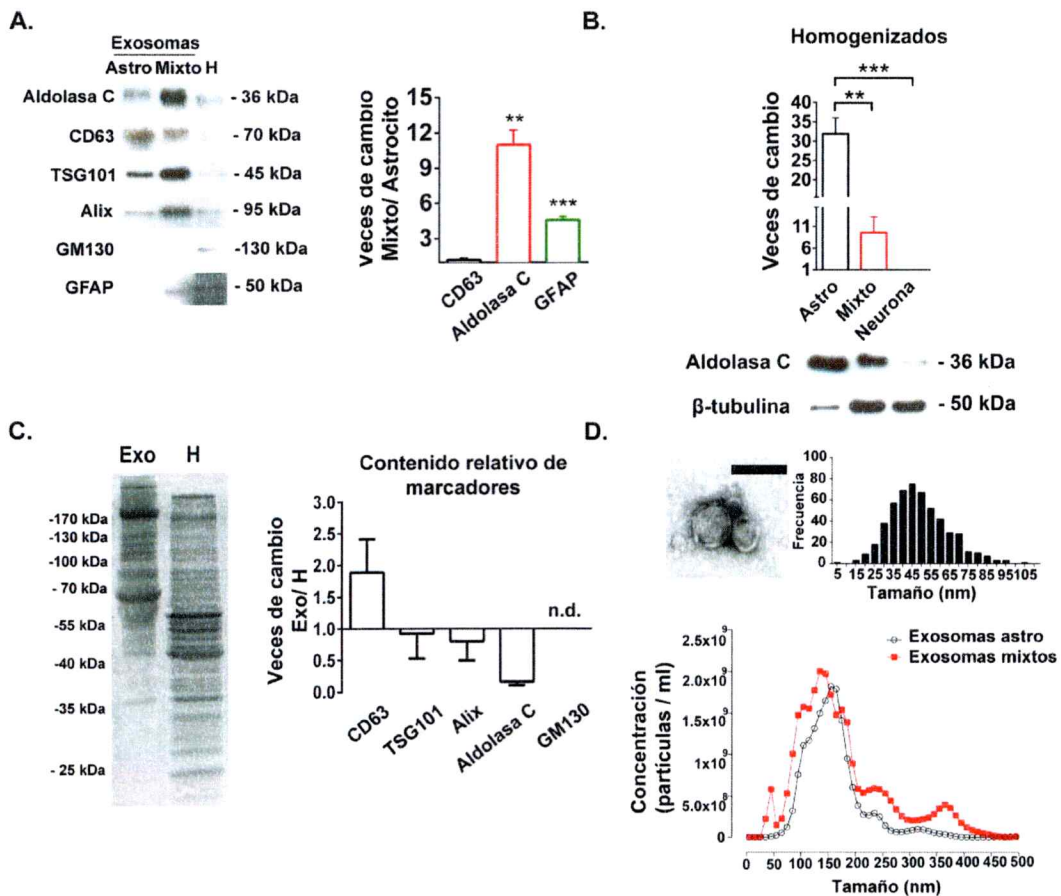
Al comparar el perfil de expresión de proteínas de los exosomas de astrocitos con el lisado celular total se observa que el patrón de bandas es consistentemente distinto para ambas muestras. En exosomas, el marcador de exosomas CD63 se enriquece  $1,88 \pm 0,05$  veces, mientras el contenido de aldolasa C es  $0,17 \pm 0,09$  veces el del homogenizado (figura 9 C). Esto comprueba que la fracción de exosomas aislada es bioquímicamente distinta al total de la célula.

Al analizar el tamaño de las vesículas de astrocitos por microscopía electrónica, encontramos que su tamaño promedio es de  $48,56 \pm 0,66$  nm, lo cual está dentro del rango reportado para exosomas. Además, se midió el diámetro de las vesículas provenientes de cultivos mixtos y de astrocitos puros mediante análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA, nanosight), el cual determina el diámetro indirectamente, midiendo su coeficiente de difusión. El tamaño promedio que arrojó este análisis fue de  $155 \pm 1$  nm y  $171 \pm 12$  nm para exosomas provenientes de astrocitos o de cultivos mixtos, respectivamente (figura 9 D).

Para complementar el análisis de tamaño y de marcadores proteicos, se realizaron ensayos de flotación en gradientes de sacarosa, y además, un ensayo de protección a proteasas para estudiar la localización intraluminal de la enzima.







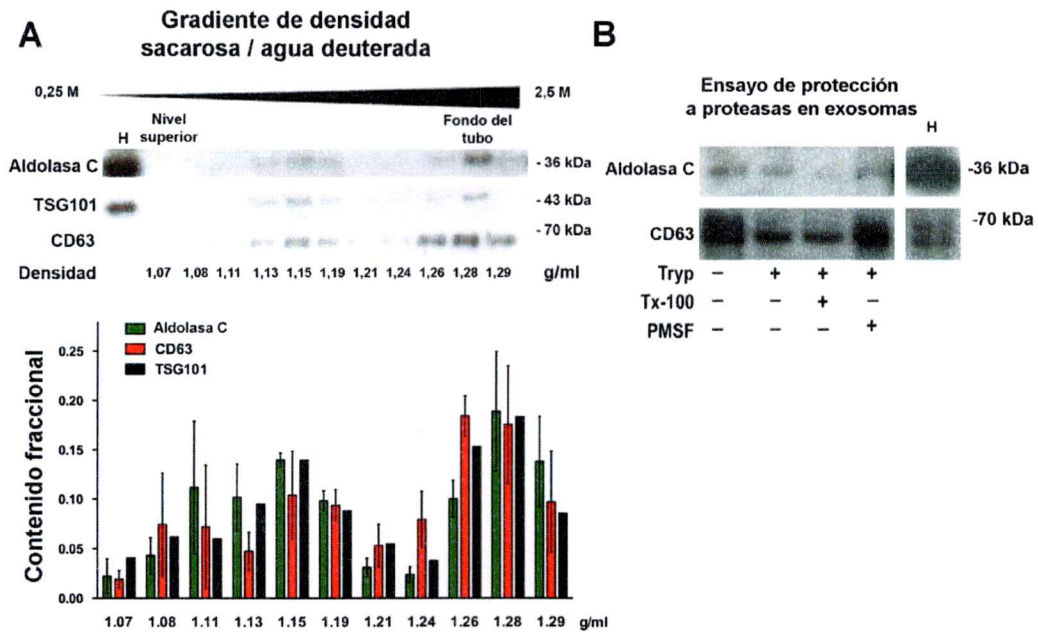
**Figura 9. Caracterización de la fracción exosomal de cultivos de astrocitos y mixtos.** **A. Izquierda**, bandas representativas de Western Blots contra aldolasa C y los marcadores de exosomas: Alix, CD63 y TSG101 en exosomas de cultivos de astrocitos (astro) y mixtos. Como marcador negativo se utilizó GM130. En ambos carriles se cargó 25 µg de proteína y 5 µg de homogenizado de astrocitos (H). Derecha, cuantificación de las veces de cambio en el contenido de aldolasa C y GFAP en exosomas de astrocitos y mixtos normalizados por CD63. Se indica el promedio ± error estándar de tres experimentos independientes (N= 3). \*\*p < 0,01\*\*\* p <0,001. Prueba t de Student no pareada contra media teórica igual a 1. **B.** Comparación del contenido de aldolasa C en homogenizados de cultivos de astrocitos, mixtos y de neuronas puras (se agregó Arabinósido C (Ara C)). Se indica el promedio ± error estándar de tres experimentos independientes (N= 3). Abajo se muestran bandas representativas de un Western Blot contra aldolasa C y β-tubulina. Se cargaron 20 µg de proteína total por carril. **C. Izquierda**, comparación del bandeo característico de homogenizados (H) y exosomas (Exo) de astrocitos. En ambos carriles se cargaron 20 µg de proteínas totales, teñidos mediante rojo Ponceau. **Derecha**, cuantificación de la razón entre el contenido

de proteínas en exosomas respecto del homogenizado. Se indica el promedio  $\pm$  error estándar de 4 experimentos independientes (N= 4). En ambos carriles se cargaron 20  $\mu$ g de proteínas totales. **D. Panel superior**, análisis de exosomas de astrocitos por microscopía electrónica de barrido, a la derecha se muestra la distribución de tamaño de las vesículas con un valor promedio de  $48,56 \pm 0,66$  nm ( $\pm$  error estándar). Barra= 100 nm. **Panel inferior**, distribución de tamaño de exosomas obtenidos de medio de astrocitos (astro) y mixto, mediante Nanosight (NTA), la media obtenida es  $155 \pm 1$  nm y  $171 \pm 12$  nm ( $\pm$  error estándar) para exosomas de astrocitos y de medio mixto, respectivamente.

## **II. Aldolasa C co-distribuye con marcadores de exosomas en gradiente de densidad dentro del lumen de los exosomas.**

Efectuamos experimentos de flotación en gradiente de densidad a partir de exosomas de cultivos mixtos (Théry y cols., 2006). Encontramos que la fracción que contiene aldolasa C co-distribuye con los marcadores de exosomas TSG101 y CD63 (figura 10 A). La cuantificación de la intensidad relativa para cada proteína en las distintas fracciones respecto de la señal total de la gradiente muestra que existen dos picos de aldolasa C, el primero está a densidades entre 1,13 g/ml y 1,19 g/ml, lo que es un rango compatible con lo descrito para exosomas (Valadi y cols., 2007). El segundo pico tiene un máximo a 1,28 mg/ml.

Para confirmar que aldolasa C se encuentra dentro del lumen de las vesículas, efectuamos un ensayo de protección a proteasas. Encontramos que tripsina degrada aldolasa C de manera notoria sólo en presencia de bajas concentraciones de Tritón X-100, lo cual es compatible con presencia de aldolasa C en el lumen de las vesículas (figura 10 B).



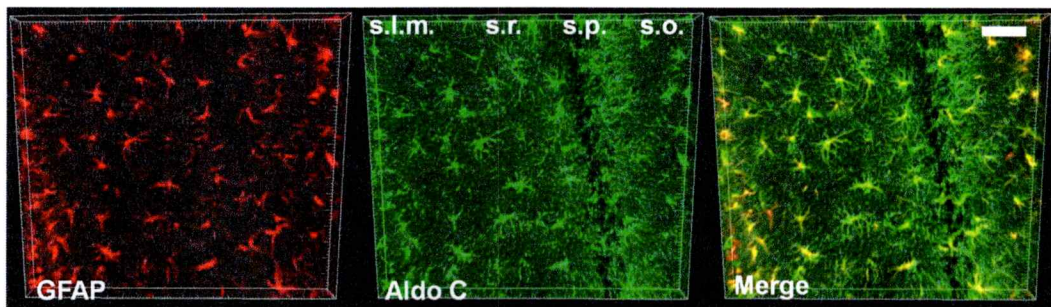
**Figura 10. Flotación de exosomas en gradiente continua de densidad y ensayo de protección a proteasas.** **A. Panel superior**, bandas representativas de Western Blots contra aldolasa C y los marcadores de exosomas: CD63 y TSG101 en las fracciones de densidad indicada. **Panel inferior**, cuantificación de la intensidad relativa para cada proteína en las distintas fracciones respecto de la señal total de la gradiente. Se indica el promedio  $\pm$  error estándar de 3 experimentos independientes para CD63 y aldolasa C (N= 3), y el promedio de 2 experimentos independientes para TSG101 (N= 2). **B.** Ensayo de protección a proteasas. Los exosomas se incubaron con tripsina (tryp) en ausencia o presencia del detergente Tritón X-100 (Tx-100). Como control, se incubó con el inhibidor de proteasas fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF). Se muestran bandas representativas de Western Blots contra aldolasa C y CD63 como marcador de exosomas. H: homogenizado de células de cultivo mixto. En cada carril se cargaron 20  $\mu$ g de proteínas totales. Figura representativa de dos experimentos independientes (N= 2).

Estos resultados muestran por primera vez que aldolasa C está presente en una fracción de tipo exosomal obtenida desde astrocitos en cultivo, cumpliendo con varios de los parámetros descritos en la literatura (ver discusión). Sin embargo, no sabemos si este mismo fenómeno sucede *in vivo*, por ejemplo,

en el SNC de rata. Para ello, se analizó su presencia en cortes histológicos y en LCR.

### III. Aldolasa C está presente en exosomas de líquido cefalorraquídeo (LCR) y aumenta en respuesta a un protocolo de estrés.

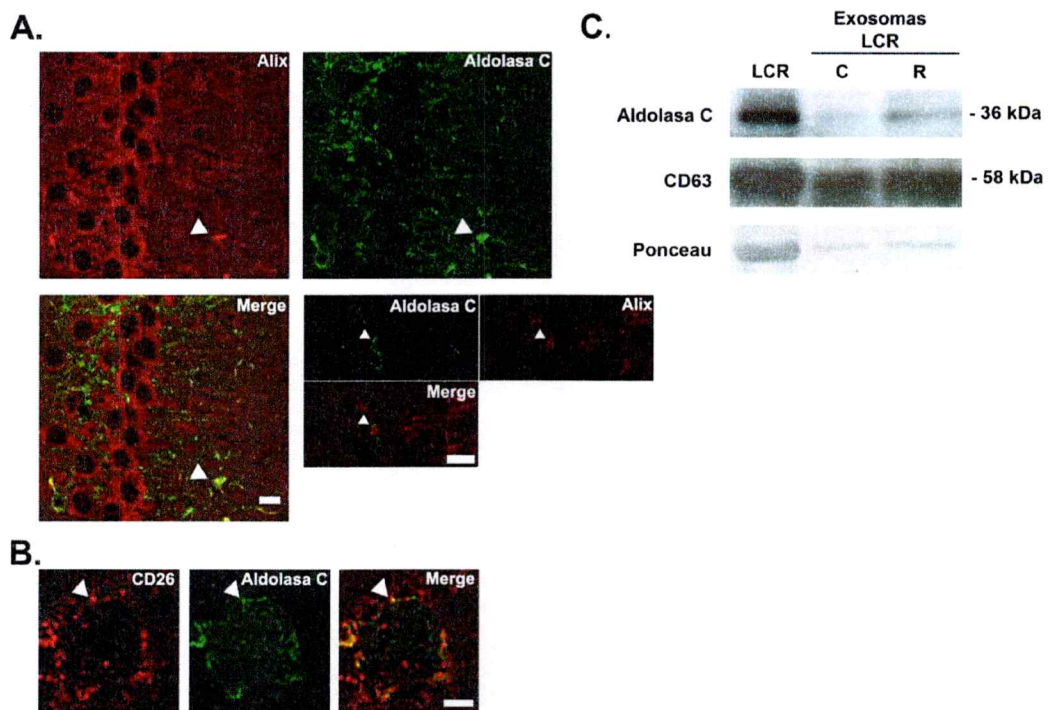
Analizamos la expresión de la enzima en cortes coronales de hipocampo, encontrando extensa co-distribución con el marcador de astrocitos GFAP y ausencia de marca en las neuronas del stratum pyramidale en la zona CA1 (figura 11). Además, aldolasa C co-distribuye con marcadores de exosomas tales como Alix y CD26, lo cual es compatible con su destinación a estructuras que dan origen a exosomas (figura 12 A y B).



**Figura 11. Expresión de aldolasa C en astrocitos de tejido hipocampal.** Proyección máxima de un z-stack confocal de una inmunohistofluorescencia contra GFAP (rojo) y aldolasa C (verde) en la región CA1 de hipocampo. s.l.m.: stratum lacunosum moleculare, s.r.: stratum radiatum, s.p.: stratum pyramidale, s.o.: stratum oriens. Barra= 100  $\mu$ m. Tinción representativa de 5 experimentos (animales) independientes (N= 5).

Basados en antecedentes del laboratorio de Neurociencias de La Universidad de Los Andes que muestran un aumento de la enzima en LCR como respuesta a un protocolo específico de estrés por restricción de movimiento, nos

preguntamos si parte de este aumento podía explicarse por liberación mediante exosomas. De forma coherente, encontramos presencia de aldolasa C en exosomas obtenidos desde LCR y, un aumento significativo de  $2,0 \pm 0,6$  veces ( $p= 0,03$ ) en su contenido en animales estresados por restricción de movimiento (figura 12 C). Este es el primer antecedente que confirma la presencia de aldolasa C en vesículas extracelulares del SNC y además sugiere que están involucradas en los cambios adaptativos asociados al estrés.



**Figura 12. Aldolasa C está presente en exosomas de líquido cefalorraquídeo y su contenido aumenta tras un protocolo de estrés por restricción de movimiento.** **A.** Corte confocal de astrocitos de stratum radiatum (s.r.) de hipocampo CA1 contiguos a neuronas piramidales. Aldolasa C (verde) rodea a las neuronas, formando cúmulos que colocalizan con Alix (rojo). Las imágenes son representativas de 4 tinciones independientes. **B.** corte confocal de un astrocitos seleccionado de s.r. (hipocampo CA1) que muestra cúmulos de

aldolasa C (verde) que co-distribuyen con CD26 (rojo), como se indica con la flecha. Barra= 5  $\mu$ m. Las imágenes son representativas de 4 tinciones en experimentos (animales) independientes (N= 4). **C.** Bandas representativas de Western Blot contra aldolasa C y el marcador de exosomas CD63 en la fracción exosomal obtenida a partir de volúmenes equivalentes, cercano a 1 ml, de líquido cefalorraquídeo (LCR) de ratas control (C) y sometidas a un protocolo de estrés crónico por restricción de movimiento (R). Como control de carga se muestra una parte de cada carril teñida mediante rojo Ponceau. Cada grupo experimental usado en los experimentos fue desarrollado con 10 a 12 animales (N= 3).

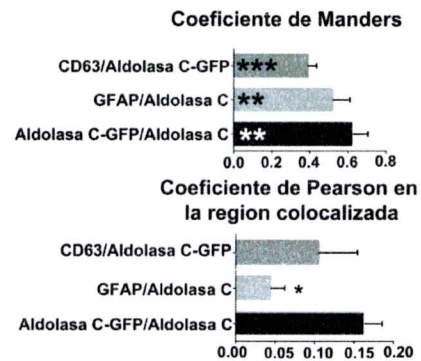
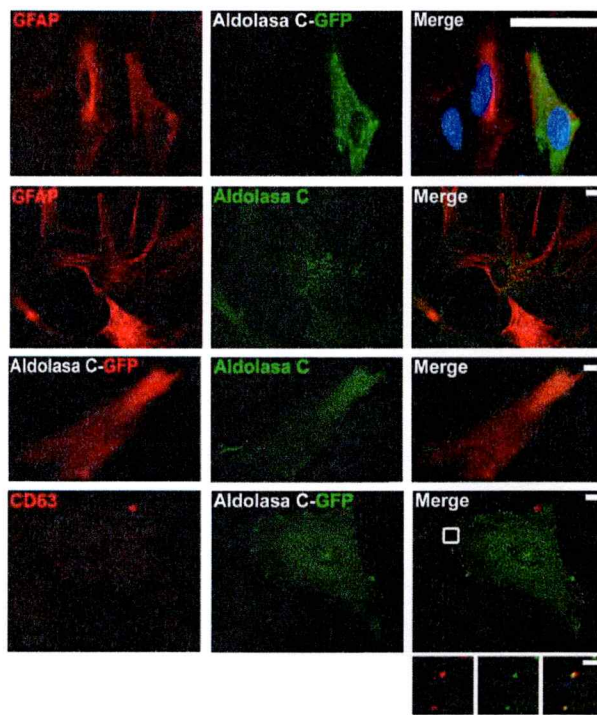
Hasta el momento, sabemos que aldolasa C está presente en exosomas de astrocitos puros y con mayor abundancia en co-cultivo con neuronas. Además, está presente en exosomas, de potencial origen astrocítico, obtenidos desde LCR cuyo contenido aumenta luego de un protocolo específico de estrés. Estos antecedentes sugieren que la enzima en exosomas podría mediar señalización entre astrocitos y neuronas. Para ello, es clave determinar si estas vesículas pueden internalizarse en ellas.

#### **IV. Destinación aldolasa C-GFP a exosomas.**

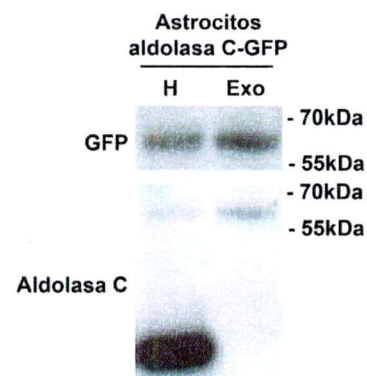
Al evaluar la expresión de aldolasa-GFP en astrocitos electroporados positivos para GFAP encontramos que la eficiencia promedio de la técnica de electroporación *in utero* fue de  $29 \pm 1$  % (n=4) (figura 13 A, primer panel). La enzima endógena forma cúmulos que decoran el citoesqueleto definido por GFAP, situación similar a la que se observó en tejido hipocampal (Sandoval y cols., 2013). Ambas marcas parecen ocupar volúmenes excluyentes del citoplasma (figura 13 A, segundo panel). La tinción contra la proteína fluorescente verde (GFP) muestra que aldolasa C-GFP forma cúmulos que co-distribuyen con CD63 (LAMP3) (figura 13 A, panel inferior), es decir, se localizaría en estructuras

que dan origen a exosomas como los CMVs. Para cuantificar el grado de asociación entre aldolasa C-GFP y CD63, los coeficientes de colocación de Manders fueron comparados con las tinciones de aldolasa C / GFAP y aldolasa C (total) / GFP (aldolasa C-GFP). Para calcular el coeficiente de Manders (figura 13 A, derecha) se consideró solamente el valor (M1) que corresponde a la colocación de la marca de aldolasa C (total) sobre GFP (aldolasa C-GFP) ( $0,62 \pm 0,17$ ); aldolasa C sobre GFAP ( $0,36 \pm 0,21$ ) y GFP (aldolasa C-GFP) sobre CD63 ( $0,39 \pm 0,09$ ). Todos los valores del coeficiente de Manders fueron significativamente superiores a 0 (valor "0" indica ausencia de colocación). Sin embargo, este análisis no es sensible a las diferencias entre las tinciones. Por lo tanto, se analizó el coeficiente de correlación Pearson en el área de colocación y se obtuvieron los siguientes valores: aldolasa C (total) / GFP (aldolasa C-GFP) ( $0,16 \pm 0,04$ ); aldolasa C (total) / GFAP ( $0,04 \pm 0,04$ ) y GFP (aldolasa C-GFP) / CD63 ( $0,09 \pm 0,08$ ) (figura 13 A, derecha). El coeficiente de correlación de Pearson para la tinción de aldolasa C (total) con GFP (aldolasa C-GFP) tuvo un valor significativamente más alto que con GFAP ( $p= 0,04$ ), pero no comparado con CD63 ( $p= 0,25$ ), lo cual apoya la co-distribución de la proteína recombinante con el marcador de exosomas CD63 y su posible destinación a exosomas. De forma coherente, mediante Western Blot comprobamos que aldolasa C-GFP es incorporada en exosomas (figura 13 B).

**A.**



**B.**



**Figura 13. Aldolasa C-GFP es incorporada en exosomas de astrocitos transfectados.** **A. Primer panel**, inmunocitofluorescencia contra el marcador de astrocitos GFAP (rojo) y la proteína fluorescente verde (GFP). **Segundo panel**, inmunocitofluorescencia contra GFAP (rojo) y aldolasa C (verde) muestra cúmulos de la enzima que se asocian al entramado del citoesqueleto definido por GFAP (imágenes deconvolucionadas). **Tercer panel**, inmunocitofluorescencia contra GFP para detectar la proteína recombinante (rojo) y contra aldolasa C para ver la enzima total (verde). **Cuarto panel**, inmunocitofluorescencia contra el marcador de exosomas CD63 (rojo) y GFP (verde) para detectar la proteína recombinante en astrocitos transfectados. En el inserto, la flecha muestra un cúmulo de CD63 (rojo) que co-distribuye con aldolasa C-GFP (verde) (imágenes deconvolucionadas). Barra: 10  $\mu$ m. Barra inserto: 1,5  $\mu$ m. **Extremo superior derecho**, cuantificación del coeficiente de Manders. Se muestra el parámetro M1 en las tinciones respectivas: aldolasa C-GFP sobre aldolasa C total; aldolasa C sobre GFAP y aldolasa C-GFP sobre CD63). Se indica el promedio  $\pm$  error estándar de de tres cultivos independientes (N= 3) donde se analizaron 4 fotografías por condición. \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ . Prueba t de Student no pareada comparado contra una media teórica de valor 0 (sin colocalización). En el gráfico inferior se muestran las medias de los coeficientes de correlación de Pearson en el área colocalizada para cada tipo de tinción. Se indica el promedio  $\pm$  error

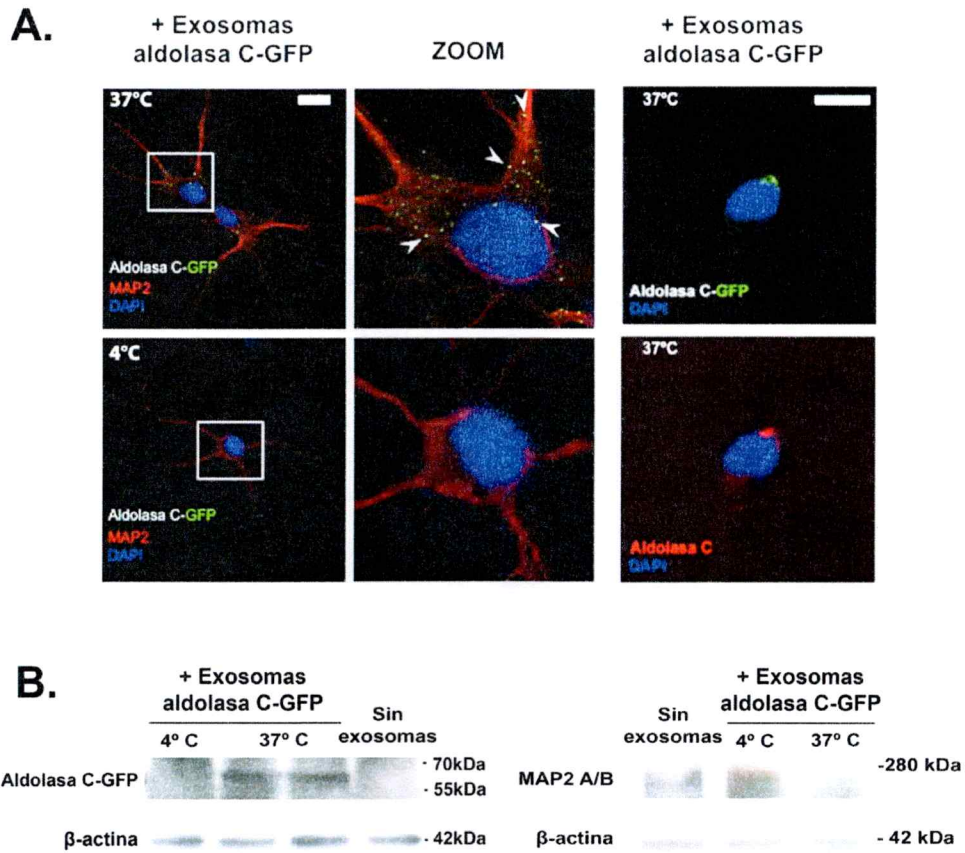


estándar de de tres cultivos independientes (N= 3) donde se analizaron 4 fotografías por condición. \*  $p < 0,05$ . ANOVA de una vía no pareado y prueba post-hoc de Tukey. **B.** Bandas representativas (N= 4) de Western Blots contra aldolasa C y contra GFP en exosomas obtenidos desde astrocitos transfectados con aldolasa C-GFP. Es posible observar la proteína recombinante tanto en homogenizado total de células como en la fracción exosomal.

A continuación estudiamos si los exosomas cargados con aldolasa C-GFP pueden transferir esta enzima a neuronas.

#### **V. Transferencia de aldolasa C-GFP a neuronas mediante exosomas y en co-cultivo.**

Para analizar la transferencia de aldolasa C hacia neuronas mediada por exosomas, se incubaron cultivos de neuronas hipocampales puros (7 DIV, 30.000 células) con 8  $\mu\text{g}$  de proteína de exosomas de astrocitos que contienen aldolasa C-GFP por 3 horas a 4° C y 37° C. La tinción de neuronas contra GFP muestra cúmulos positivos en el soma y rodeando íntimamente los procesos definidos por MAP2 A/B exclusivamente a 37° C (figura 14 A).



**Figura 14. Internalización de exosomas que contienen aldolasa C-GFP en neuronas.** **A. Panel izquierdo**, corte confocal de una inmunocitofluorescencia contra MAP2 A/B (rojo) y GFP (verde) en neuronas hipocámpales de 7 DIV incubadas con 8  $\mu\text{g}$  (20  $\text{ng}/\mu\text{l}$  en 400  $\mu\text{l}$ ) de exosomas de astrocitos que contienen aldolasa C-GFP por 3 horas a 4° C y 37°, en el inserto se señalan con flechas las estructuras punteadas positivas para aldolasa C-GFP. Barra= 10 $\mu\text{m}$ . **Panel derecho**, imagen epifluorescente de una inmunocitofluorescencia en neuronas hipocámpales incubadas con exosomas en las condiciones anteriormente descritas, la marca positiva para la enzima recombinante (verde, GFP) tiene una distribución similar a la enzima total (rojo, aldolasa C). Barra = 20  $\mu\text{m}$ . Todas las imágenes son representativas de dos experimentos independientes (N= 2). **B. Panel izquierdo**, bandas representativas de Western Blots contra GFP y  $\beta$ -actina (control de carga) en cultivos corticales puros de neuronas de 15 DIV incubados con exosomas obtenidos desde cultivos de astrocitos electroporados con aldolasa C-GFP (7,5  $\mu\text{g}$  de proteínas totales) durante 3 horas a 4° C y 37° C. **Panel derecho**, bandas representativas de Western Blot contra MAP2 A/B y  $\beta$ -actina

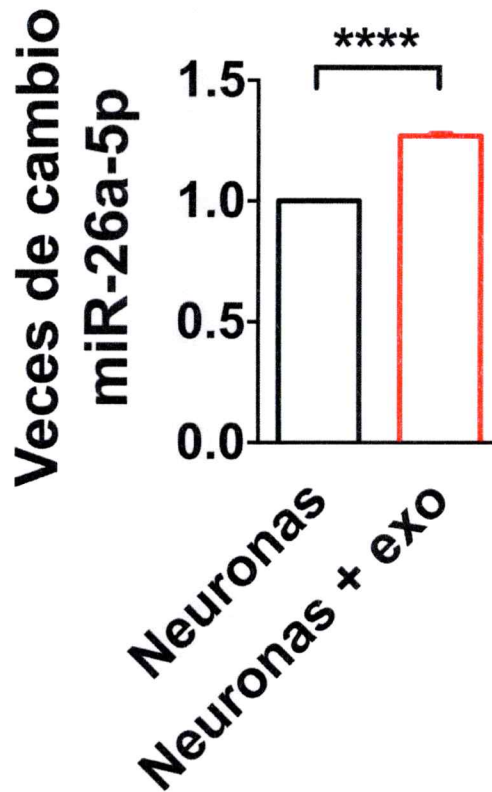
(control de carga), en neuronas corticales incubadas con exosomas que contienen aldolasa C-GFP (concentración= 7,5 ng/ $\mu$ l) durante 3 horas a 4°C y 37°C. Resultados representativo de dos experimentos independientes (N= 2).

Como estrategia adicional, cultivos corticales de neuronas puras de 15 DIV, se incubaron con 7,5  $\mu$ g de proteína de exosomas de astrocitos que contienen aldolasa C-GFP por 3 horas a 37° C y 4° C, para luego lavar y lisar las células. Mediante Western Blot, se observó que la marca de GFP aparece exclusivamente en las neuronas tratadas e incubadas a 37° C (figura 14 B, panel izquierdo), lo que sugiere que un fenómeno activo, dependiente de temperatura, media la internalización de los exosomas portadoras de aldolasa C en neuronas.

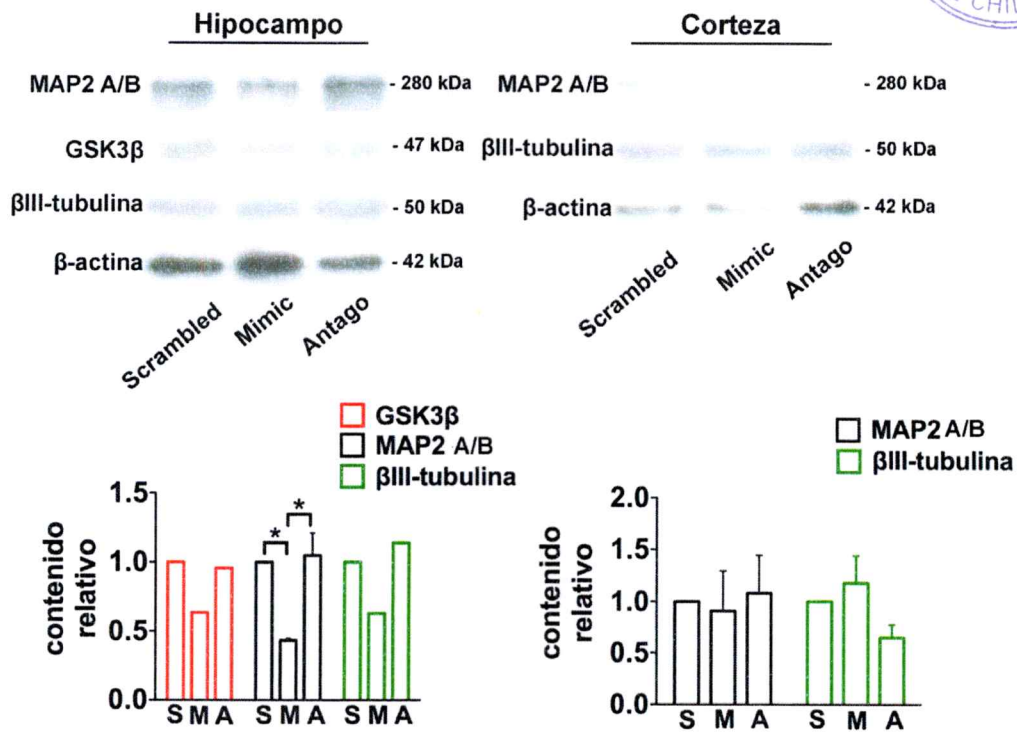
De manera concomitante, encontramos que los niveles totales de MAP2 A/B decaen en aquellas neuronas que fueron incubadas a 37° C y no a 4° C (figura 14 B, panel derecho), lo cual sugiere que la internalización de exosomas introduce un componente que regula los niveles de la proteína MAP2 A/B. Esto es compatible con nuestra hipótesis de que los exosomas de astrocitos transportan miR-26a-5p, puesto que MAP2 A/B es un blanco comprobado para este RNA no codificante. En este sentido, mediante RT-PCR cuantitativo, encontramos que la incubación de neuronas hipocampales con 7,5  $\mu$ g de proteína de exosomas de astrocitos produce un aumento de  $27 \pm 1\%$  ( $p= 0,0001$ ) en el contenido total de miR-26a-5p (figura 15). Además, encontramos que la transfección de cultivos hipocampales de 3 DIV con un oligo nucleótido que imita el efecto de miR-26a-5p (mimic) produce, luego de 72 horas, una disminución de

0,43  $\pm$  0,02 veces en el contenido de MAP2 A/B ( $p=0,03$ ) (figura 16, panel izquierdo), lo cual recapitula el efecto inducido por la internalización de exosomas, mientras que un oligo-nucleótido que inhibe el efecto de miR-26a-5p (antago), no cambia significativamente la expresión de MAP2 A/B ( $1 \pm 0,3$ ,  $p=0,92$  vs. scrambled). Además, el mimic produce una disminución concomitante de 0,63 veces ( $n=2$ ) en el contenido de GSK3 $\beta$  (blanco comprobado para miR-26a-5p) y de 0,62 veces ( $n=2$ ) en el contenido de  $\beta$ III-tubulina.

Sorprendentemente, el efecto sobre MAP2 A/B y  $\beta$ III-tubulina no se reproduce en neuronas corticales, puesto que los cambios producidos por el mimic fueron de  $0,9 \pm 0,7$  veces ( $p=0,9$ ) y de  $1,2 \pm 0,6$  veces ( $p=0,99$ ), respectivamente (figura 16, panel derecho). Con el antago, MAP2 A/B tendió a mantenerse estable en células corticales ( $1,0$  veces  $\pm 0,4$ ;  $p=0,98$ ), mientras que  $\beta$ III-tubulina tendió a disminuir ( $0,6$  veces,  $n=2$ ). Estos resultados sugieren que neuronas corticales e hipocampales utilizan mecanismos distintos para responder a miR-26a-5p, los cuales serán abordados en la discusión.



**Figura 15. MiR-26a-5p es transferido mediante exosomas de astrocitos a neuronas hipocampales.** Se muestra el cambio en el contenido de miR-26a-5p, medido por RT-PCR cuantitativo, en neuronas hipocampales de 6 DIV incubadas con 7,5  $\mu$ g exosomas de astrocitos control durante 3 horas a 37° C. Valores normalizados por el contenido de U6. Ct (ciclo umbral) promedio de miR-26a-5p sin normalizar para neuronas = 27,12; Ct de miR-26a-5p promedio de neuronas + exosomas= 26,76. Se indica el promedio  $\pm$  error estándar de tres experimentos independientes (N= 3). \*\*\*\* $p$ < 0,0001. Prueba t de Student no pareada.



**Figura 16. MiR-26a-5p induce disminución de los niveles de MAP 2 A/B en neuronas hipocámpales, pero no corticales. Panel superior.** Bandas representativas de Western Blots contra MAP2 A/B, GSK3β, βIII-tubulina y β-actina (como control de carga) en neuronas hipocámpales y/o corticales de 6 DIV transfectadas a los 3 DIV con: una secuencia control (scrambled, S); un oligo nucleótido sintético con la misma secuencia de miR-26a-5p (mimic, M) y un oligo-nucleótido sintético que inhibe la acción de miR-26a-5p (antago, A). **Panel inferior.** Cuantificación del contenido de las bandas de Western Blot normalizadas con β-actina. Se indica el promedio ± error estándar de tres experimentos independientes (N=3) para MAP2 A/B en hipocampo y corteza. Las cuantificaciones sin barra de error corresponden al promedio de dos experimentos independientes (N= 2). \* p< 0,05. ANOVA de una vía pareado y prueba post-hoc de Tukey.

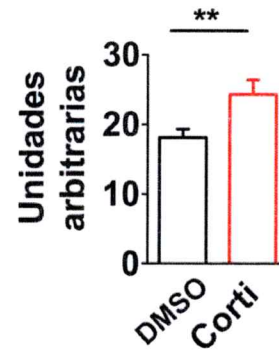
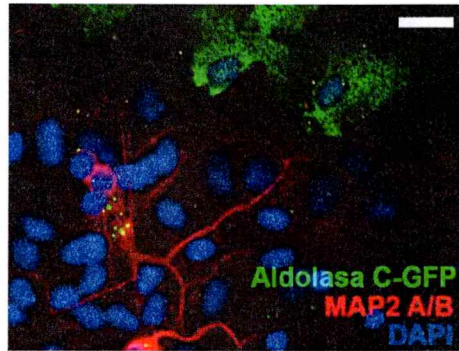
Habiendo comprobado que los exosomas de astrocitos son capaces de internalizarse en neuronas y producir cambios en su contenido proteico, potencialmente mediados por miR-26a-5p, resta evaluar si la transferencia de

aldolasa C puede realizarse en condiciones más fisiológicas como lo sería en co-cultivo neurona/astrocito. Para ello, agregamos astrocitos que expresan aldolasa C-GFP a neuronas corticales sin transfectar, y además, reproducimos "in vitro" una situación de estrés estimulando los cultivos con corticosterona.

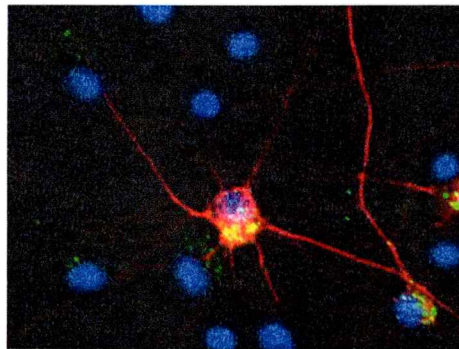
#### **VI. Corticosterona induce transferencia de aldolasa C-GFP a neuronas posiblemente mediada por exosomas.**

Evaluamos el efecto que tiene la estimulación con corticosterona 1  $\mu$ M en un sistema de co-cultivo en donde astrocitos que expresan aldolasa C-GFP fueron agregados a neuronas corticales de 3 DIV para evaluar su efecto tras 72 horas de co-cultivo. Encontramos cúmulos positivos para aldolasa C-GFP en somas neuronales en condición control y un aumento significativo en la intensidad de la marca de aldolasa C-GFP en los somas de neuronas estimuladas con corticosterona:  $18 \pm 9$  v/s  $24 \pm 12$  u.a. (unidades arbitrarias) ( $p=0,007$ ) (figura 17 A). Para determinar si la transferencia inducida por corticosterona puede explicarse mediante exosomas, estimulamos astrocitos puros de 15 DIV que expresan aldolasa C-GFP con corticosterona 1  $\mu$ M durante 24 horas. Encontramos un aumento promedio de 3,1 veces ( $n=2$ ) en el contenido de aldolasa C-GFP en exosomas, cuya intensidad fue normalizada por CD63 (figura 17 B). Estos resultados sugieren que el aumento de aldolasa C en exosomas, inducido por corticosterona, podría explicar la mayor transferencia de la enzima a neuronas.

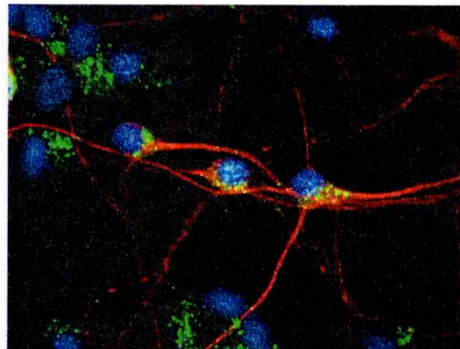
**A. Control**



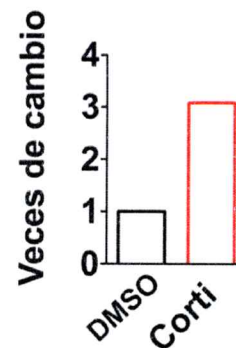
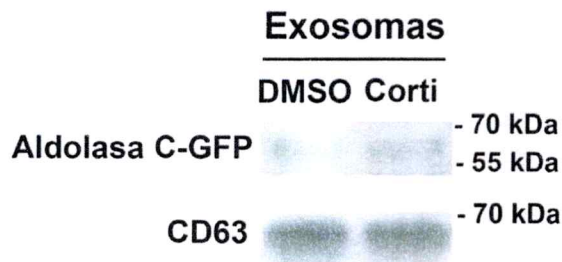
**DMSO**



**Corti**



**B.**



**Figura 17. Costicosterona induce aumento en los niveles de aldolasa C-GFP en el soma de neuronas corticales en co-cultivo con astrocitos electroporados. A. Panel superior.** Inmuncitofluorescencia contra MAP2 A/B (rojo) y GFP (verde) en co-cultivos hechos con astrocitos que sobre-expresan aldolasa C-GFP y que se agregan a neuronas puras (3 DIV) durante 72 horas. Se indica la condición control y luego de 1 hora de estimulación con vehículo



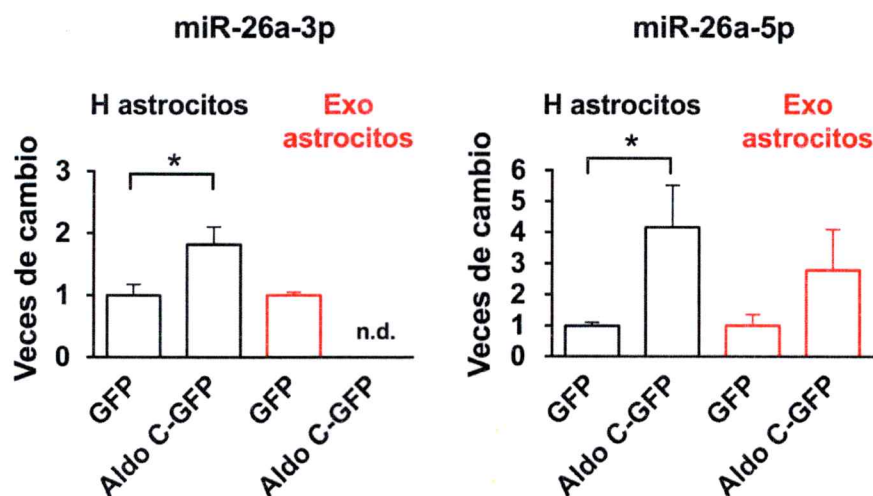
(DMSO) o corticosterona 1  $\mu$ M (Corti). Barra = 20  $\mu$ m. **Panel superior derecho**, cuantificación de la intensidad total de fluorescencia de la tinción contra GFP en los somas de las neuronas definidas por MAP2A/B en condición vehículo (DMSO) y estimulada (corti). Se analizaron neuronas control (n= 58) y neuronas corti (n=32) \*\*p< 0,01. Prueba t de Student no pareada. **B.** Bandas representativas de Western Blots utilizando anticuerpos contra CD63 y GFP (para detectar aldolasa C-GFP) en exosomas obtenidos desde cultivos de astrocitos puros (15 DIV) que expresan aldolasa C-GFP estimulados con vehículo (DMSO) o con corticosterona 1  $\mu$ m (corti) durante 24 horas. En cada carril se cargaron 6  $\mu$ g de proteínas totales. **Derecha**, cuantificación de los cambios observados, se indica el promedio de dos experimentos independientes normalizados por CD63 (N= 2).

Hemos visto que los exosomas de astrocitos pueden internalizarse en neuronas transfiriendo aldolasa C y miR-26a-5p. Entonces, resta determinar si aldolasa C puede interactuar con miR-26a y cómo se vincula su presencia en astrocitos con el contenido de este miRNA en exosomas.

#### **VII. Contenido de miR-26a-5p aumenta en homogenizados y exosomas de astrocitos que sobre-expresan aldolasa C-GFP.**

Para correlacionar la presencia de aldolasa C en exosomas de astrocitos con los niveles de miR-26a, evaluamos la presencia de ambas hebras (5p y 3p) en lisados de astrocitos que expresan GFP, aldolasa C-GFP y en exosomas derivados de ellos. Tal como se muestra en la figura 18, la sobre-expresión de aldolasa C-GFP en astrocitos induce un aumento estadísticamente significativo de  $1,8 \pm 0,3$  veces ( $p=0,03$ ) en el contenido de miR-26a-3p y de  $4 \pm 1$  veces ( $p=0,02$ ) en el contenido de miR-26a-5p. En exosomas, la sobre-expresión de aldolasa C-GFP produce un aumento de  $2,8 \pm 1$  veces ( $p=0,2$ ) en el contenido de miR-26a-5p, mientras que miR-26a-3p disminuye a niveles bajo el límite de detección, aun cuando sus niveles son medibles en exosomas controles (Ct

promedio= 33,8). Los cálculos de veces de cambio fueron normalizados por U6 el cual es un gen que se expresa de manera abundante y constitutiva en todas las células, puesto que es parte de la maquinaria de “corte y empalme”. La normalización en cada caso se realizó entre las condiciones experimentales, en homogenizados de astrocitos o en exosomas. Estos resultados muestran que los niveles celulares de aldolasa C se asocian positivamente con un aumento en el nivel de miR-26a-5p tanto en la célula como en exosomas.

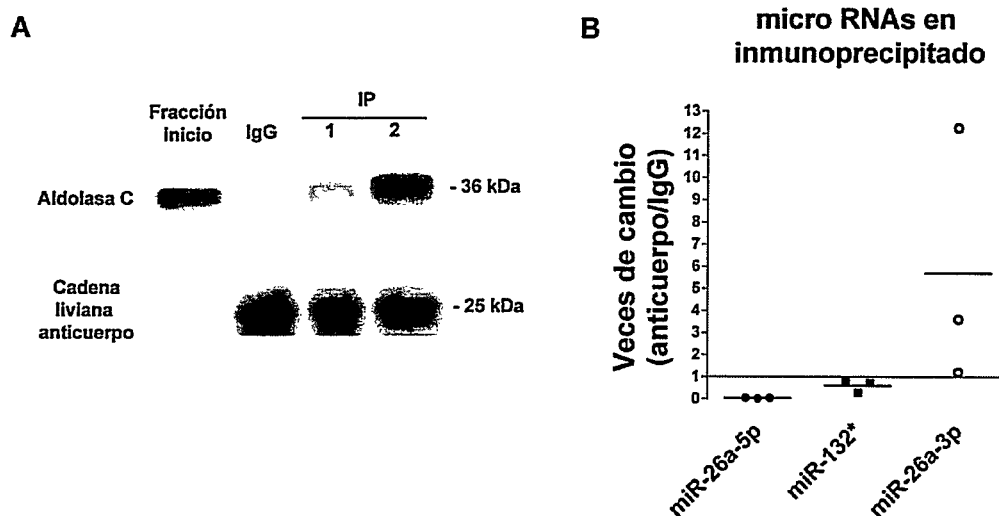


**Figura 18. Contenido de miR-26a-5p y miR-26a-3p aumenta por sobre-expresión de aldolasa C-GFP.** Cuantificación por RT-PCR cuantitativo en el contenido relativo de miR-26a, 3p o 5p, en homogenizados y exosomas de astrocitos que sobre-expresan GFP (control) y aldolasa C-GFP (aldo C-GFP). Todos los valores fueron normalizados entre condiciones por el contenido de U6. Se indica promedio  $\pm$  error estándar de cuatro experimentos independientes para homogenizados (N= 4) y tres para exosomas (N= 3). \* $p < 0,05$ , prueba U de Mann-Whitney. Los valores promedios para los ciclos umbrales obtenidos (Ct) sin normalizar son los siguientes. Ct promedio de miR-26a-5p para homogenizados de astrocitos GFP = 21, 2; Ct promedio de miR-26a-5p para homogenizados de astrocitos aldolasa C-GFP= 20,1; Ct promedio de miR-26a-3p para homogenizados de astrocitos GFP= 34,2; Ct promedio de miR-26a-3p para homogenizados de astrocitos aldolasa C-GFP = 32,8; Ct promedio de miR-26a-

3p para homogenizados de astrocitos aldolasa C-GFP= 34,2; Ct promedio de miR-26a-5p para exosomas de astrocitos GFP= 28,6; Ct promedio de miR-26a-5p para exosomas de astrocitos aldolasa C-GFP= 32,17; Ct promedio miR-26a-3p para exosomas de astrocitos GFP= 33,8.

Como nuestra hipótesis es que aldolasa C es transferida a neuronas asociada a miR-26a, inmunoprecipitamos la enzima desde lisado total de astrocitos para luego extraer RNAs. Ajustamos un protocolo de inmunoprecipitación, usando distintas condiciones de estrictez (variando fuerza iónica, cantidad y tipo de detergente, ver metodología). Fuimos capaces de inmunoprecipitar cerca del 4,12 % del contenido total de aldolasa C presente en un cultivo de astrocitos, lavando con el tampón RIPA (condición 2, figura 19 A). Con un protocolo más estricto (condición 1, figura 19 A), usado para la técnica Clip-seq, se logró capturar sólo el 0,68 % del total de la enzima. A partir de la inmunoprecipitación más eficiente (condición 2), se extrajo el RNA total. Mediante RT-PCR cuantitativo comparamos las veces de cambio en el pellet, usando el anticuerpo contra aldolasa C (Santa Cruz), respecto del control negativo (usando IgG de suero pre-inmune de cabra) y corrigiendo carga por los niveles del RNA no codificante U6. En oposición a lo esperado, encontramos un aumento selectivo, aunque no estadísticamente significativo, para la hebra 3p de miR-26a ( $5,6 \pm 3$  veces,  $p= 0,3$ ), mientras que no se observó aumento para miR-132\*, un miRNA abundante en astrocitos, ni para la hebra 5p de miR-26a (figura 19 B). Estos resultados sugieren que aldolasa C es capaz de formar parte de un complejo de interacción con la hebra 3p de miR-26a en astrocitos, quedando pendiente un experimento similar utilizando exosomas como material de partida.

En todo caso, este resultado sugiere fuertemente que la enzima tiene el potencial de interactuar con este tipo de ácidos nucleicos.



**Figura 19. Aldolasa C co-inmunoprecipita con miR-26a-3p.** **A. Inmunoprecipitación de aldolasa C.** Se muestra el Western Blot contra aldolasa C en dos experimentos de inmunoprecipitación usando protocolos de diferente estrictez (1 y 2, ver metodología). **B. RT-PCR cuantitativo** para la forma madura de miR-26a-5p, miR-26a-3p y miR-132\*, a partir del RNA presente en el inmunoprecipitado de cada condición. Cada valor de miRNA está normalizado por el valor del control negativo (IgG del suero pre-inmune) y U6 (como control de carga). Cada punto representa un experimento independiente y la barra horizontal el promedio de ellos (N= 3). Los promedios de los ciclos umbrales (Ct) obtenidos para el inmunoprecipitado con el anticuerpo de aldolasa C sin normalizar son los siguientes: Ct miR-26a-3p = 32; Ct miR-26a-5p= 25,2; miR-132\*= 30.

Hemos visto que los niveles de expresión de aldolasa C en astrocitos regulan la cantidad de miR-26a en astrocitos y exosomas. Observamos también que aldolasa C forma un complejo de interacción con la hebra 3p en homogenizado de astrocitos. Sin embargo, no sabemos cómo se vinculan estos

fenómenos con un efecto funcional sobre las neuronas. Por lo tanto, determinaremos el papel de estos dos componentes en los cambios morfológicos inducidos por exosomas de astrocitos en neuronas.

#### **VIII. Exosomas de astrocitos que sobre-expresan aldolasa C-GFP disminuyen la complejidad y largo de los procesos neuríticos en neuronas hipocampales.**

Para correlacionar la presencia de aldolasa C en exosomas con su efecto sobre la morfología neuronal, comparamos el efecto de exosomas derivados de astrocitos que sobre-expresan GFP (exosomas GFP) con los que sobre-expresan aldolasa C-GFP (exosomas aldolasa C-GFP). Ambos cultivos fueron generados mediante electroporación *in utero* en embriones de la misma rata y bajo las mismas condiciones de cultivo. Los exosomas de cada condición fueron aislados en paralelo para estimular neuronas hipocampales de 3 DIV por 72 horas con 4 µg de proteínas totales de exosomas a una concentración de 10 ng/ µl (en 400 µl). Luego, las neuronas fueron fijadas y teñidas contra MAP2 A/B para analizar la morfología mediante análisis de Sholl (ver metodología).

Ambos tipos de exosomas tienden a disminuir el largo y complejidad de la arborización dendrítica respecto al control, sin embargo, mientras los exosomas aldolasa C-GFP producen cambios estadísticamente significativos en todos los parámetros, los exosomas GFP disminuyen de manera estadísticamente significativa solamente las ramificaciones primarias. Si bien los exosomas aldolasa C-GFP inducen una disminución más pronunciada que los exosomas

GFP en todos los parámetros, el valor crítico es el único parámetro que tiene una diferencia estadísticamente significativa entre estos dos grupos. En la figura 20 A y B se muestran las diferencias en la morfología de los grupos y la cuantificación de los parámetros que se describen a continuación. La significancia estadística mostrada es vs. control en todos los casos, excepto cuando se especifica. Ramificación total (número total de intersecciones):  $141 \pm 12$  para el control vs.  $113 \pm 15$  para exosomas GFP ( $p= 0,11$ ) y  $89 \pm 21$  para exosomas aldolasa C-GFP ( $p= 0,02$ ). Radio máximo:  $107 \pm 8 \mu\text{m}$  para el control vs.  $99 \pm 14 \mu\text{m}$  para exosomas GFP ( $p= 0,54$ ) y  $83 \pm 15 \mu\text{m}$  para exosomas aldolasa C-GFP ( $p= 0,04$ ). Ramificaciones primarias (intersecciones en primer radio):  $6,62 \pm 0,06$  para el control vs.  $6,0 \pm 0,2$  para exosomas GFP ( $p= 0,04$ ) y  $5,4 \pm 0,07$  para exosomas aldolasa C-GFP ( $p= 0,005$ ). Ramificación máxima (máximo número de intersecciones):  $8,6 \pm 0,4$  para el control vs.  $7,5 \pm 0,33$  para exosomas GFP ( $p= 0,09$ ) y  $6,6 \pm 0,5$  para exosomas aldolasa C GFP ( $p= 0,01$ ). Valor crítico:  $22 \pm 1 \mu\text{m}$  para el control vs.  $21 \pm 2 \mu\text{m}$  para exosomas GFP ( $p= 0,3$ ) y  $17 \pm 2 \mu\text{m}$  para exosomas aldolasa C-GFP ( $p= 0,007$  y  $0,04$  vs. Exosomas GFP). En la figura 20 C se muestra la expresión de ambas proteínas recombinantes en cultivos desde los cuales se aislaron exosomas.

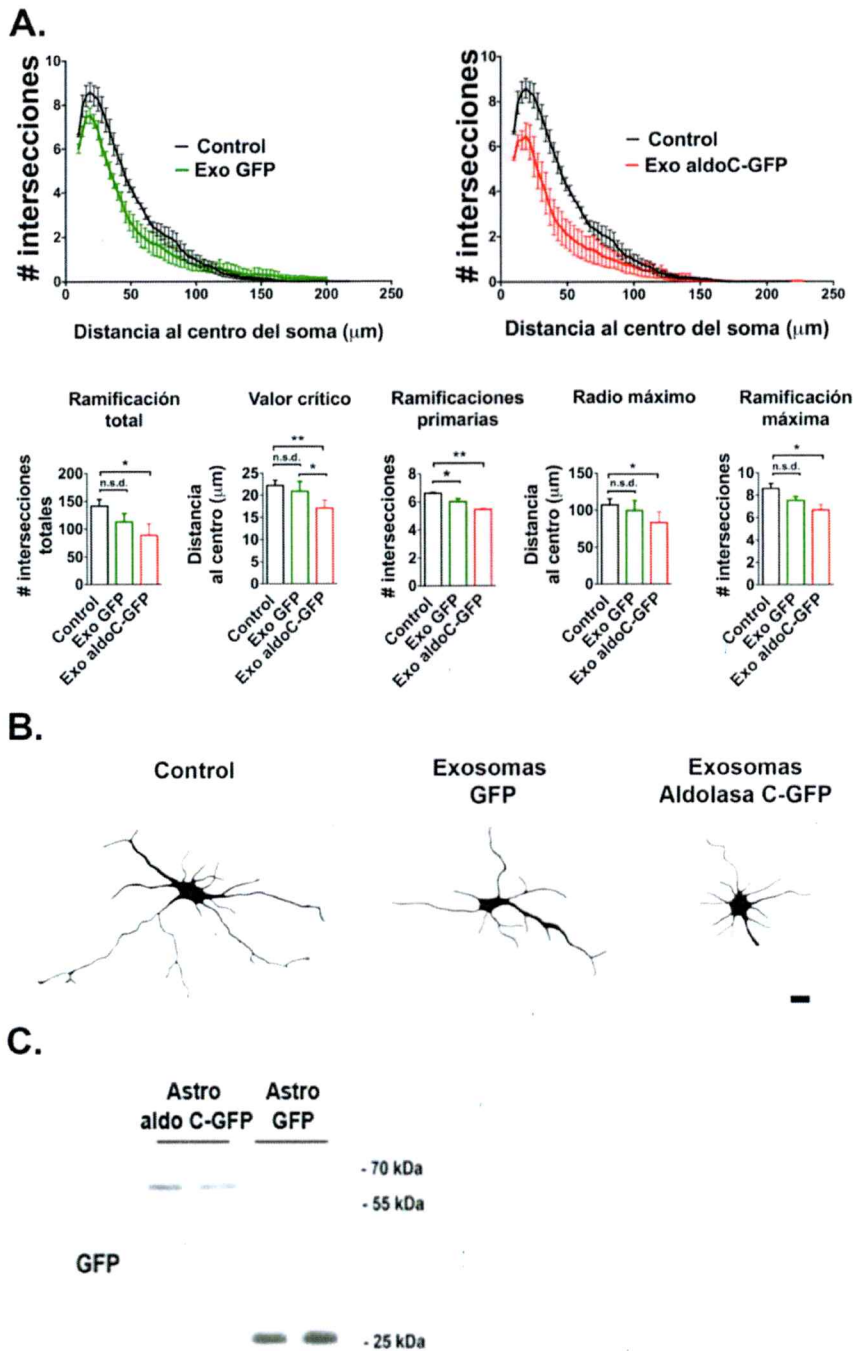


Figura 20. Exosomas de astrocitos que sobre-expresan aldolasa C-GFP disminuyen la complejidad y largo de los procesos neuríticos. **A.** Panel superior, número de intersecciones con círculos concéntricos de radio creciente ( $3 \mu\text{m}$ , análisis de Sholl) en neuronas hipocámpicas de 3 DIV tratadas con 10

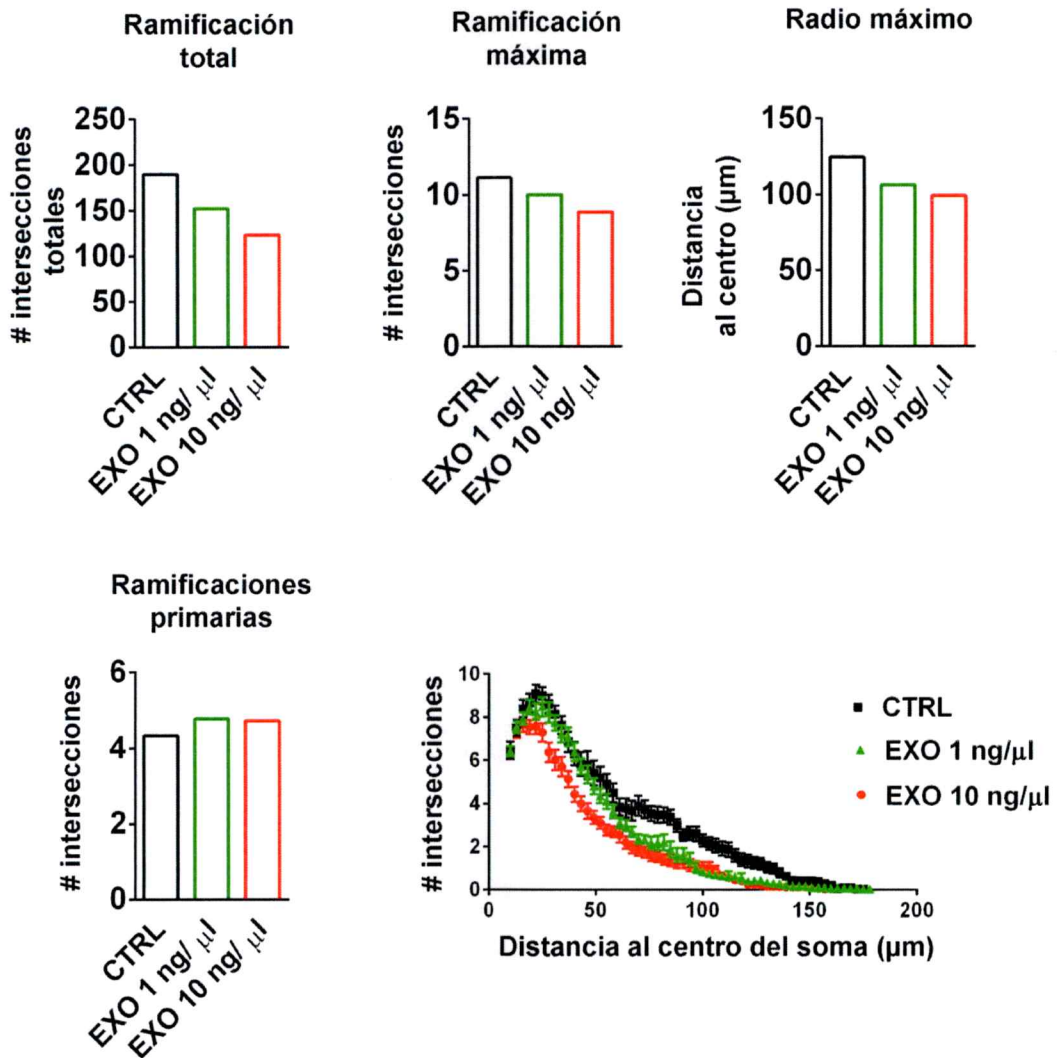
ng/ $\mu$ l (rojo) de exosomas derivados de astrocitos que sobre-expresan aldolasa C-GFP (curva roja) o GFP (curva verde) por 72 horas y teñidas contra MAP2 A/B. La curva control (negro) corresponde a neuronas del mismo cultivo, pero sin tratar. **Panel inferior**, cuantificación de los parámetros morfológicos que se indican. Los gráficos y cada punto de las curvas muestran el promedio  $\pm$  error estándar de tres experimentos independientes (N= 3) donde se analizaron 30-50 células por condición de manera aleatoria. \* $p < 0,05$ . ANOVA de una vía y prueba post-hoc de Tukey. **B.** Imágenes epifluorescentes de una inmunocitofluorescencia contra MAP2 A/B representativa de los cambios morfológicos observados en neuronas control y tratadas con exosomas de astrocitos que sobre-expresan aldolasa C o GFP. Barra = 10  $\mu$ m **C.** Bandas de Western Blot contra GFP en lisado de cultivo de astrocitos provenientes de cerebros electroporados con dosis equivalentes de plasmidios que codifican para GFP y aldolasa C-GFP. Los medios fueron colectados y procesados en paralelo (N= 2 por condición).

Una vez descrito el efecto de los exosomas aldolasa C-GFP sobre los parámetros morfológicos, determinamos si sus efectos son concentración-dependientes. Para ello, estimulamos neuronas hipocámpales con 1 y 10 ng/ $\mu$ l de exosomas.

En la figura 21, se muestra la cuantificación del promedio de dos experimentos independientes para los siguientes parámetros. Ramificación total (número total de intersecciones): 189 para el control vs. 152 para exosomas 1 ng/ $\mu$ l y 122 para exosomas 10 ng/ $\mu$ l. Radio máximo: 124  $\mu$ m para el control vs. 106  $\mu$ m para exosomas 1 ng/ $\mu$ l y 99  $\mu$ m para exosomas 10 ng/ $\mu$ l; Ramificaciones primarias (intersecciones primer radio): 4,3 para el control vs 4,8 para exosomas 1 ng/ $\mu$ l y 4,7 para exosomas 10 ng/ $\mu$ l. Ramificación máxima (máximo número de intersecciones): 11,1 para el control vs. 10 para exosomas 1 ng/ $\mu$ l y 8,8 para exosomas 10 ng/ $\mu$ l. Encontramos que la ramificación total y el radio máximo



disminuyen de forma graduada en ambas concentraciones respecto del control. Sin embargo, la ramificación total es el parámetro más sensible al aumento de concentración de los exosomas.



**Figura 21. Dosis-dependencia del efecto morfológico de exosomas de astrocitos que sobre-expresan aldolasa C-GFP.** Se muestran los parámetros del análisis de Sholl en neuronas hipocámpicas de 3 DIV incubadas por 72 horas con exosomas 1 ng/µl (barra verde) y 10 ng/µl (barra roja). Se utilizó tinción contra MAP2 A/B. **Panel inferior derecho**, número de intersecciones de neuritas con círculos concéntricos de radio creciente de 3 µm). La curva control (negra) corresponde a neuronas del mismo cultivo, pero sin tratar. En cada punto de las

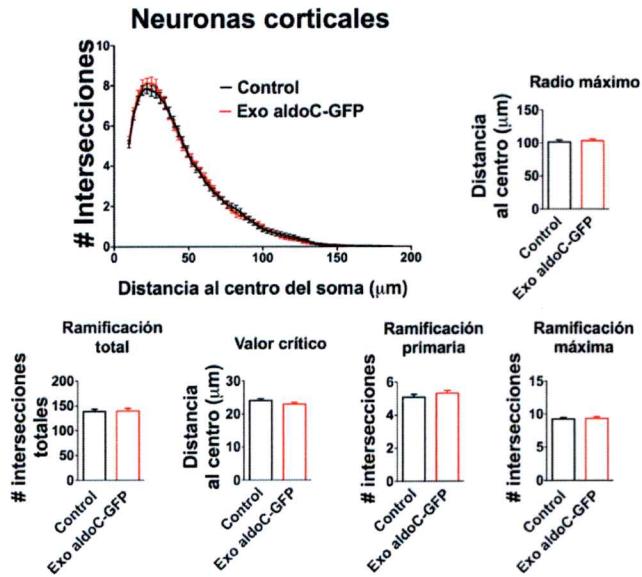
curvas y los gráficos se muestra el promedio  $\pm$  error estándar de dos experimentos independientes donde se analizaron 30-50 células por condición de manera aleatoria.

### **IX. Exosomas derivados de astrocitos que sobre-expresan aldolasa C-GFP no afectan la morfología de neuronas corticales.**

Para comprobar que el efecto morfológico observado en neuronas hipocampales es extensible a neuronas de la corteza cerebral, se repitieron los mismos experimentos, comparando neuronas de origen hipocampal como cortical obtenidas en la misma fecha de cultivo y desde los mismos cerebros. En neuronas hipocampales, se repitió el resultado ya descrito con una disminución en la ramificación total y radio máximo, mientras los demás parámetros mantienen la tendencia anteriormente descrita. Los valores de los parámetros para neuronas hipocampales (figura 22 A) se describen a continuación. Ramificación total (número total de intersecciones):  $159 \pm 13$  para el control vs.  $106 \pm 7$  para exosomas  $10 \text{ ng}/\mu\text{l}$  ( $p= 0,01$ ). Radio máximo:  $111 \pm 5 \mu\text{m}$  para el control vs.  $89 \pm 3 \mu\text{m}$  para exosomas  $10 \text{ ng}/\mu\text{l}$  ( $p= 0,005$ ). Ramificaciones primarias (intersecciones primer radio):  $6,0 \pm 0,5$  para el control vs.  $5,5 \pm 0,5$  para exosomas  $10 \text{ ng}/\mu\text{l}$  ( $p= 0,18$ ). Ramificación máxima (máximo número de intersecciones):  $8,2 \pm 0,4$  para el control vs.  $7,3 \pm 0,3$  para exosomas  $10 \text{ ng}/\mu\text{l}$  ( $p= 0,88$ ). Valor crítico:  $23 \pm 1 \mu\text{m}$  para el control y  $20 \pm 0,8 \mu\text{m}$  para exosomas  $10 \text{ ng}/\mu\text{l}$  ( $p= 0,18$ ). Sorprendentemente, estos mismos exosomas no produjeron cambios morfológicos estadísticamente significativos en neuronas corticales, donde los valores para los parámetros obtenidos se describen a continuación

(figura 22 B). Ramificación total (número total de intersecciones):  $138,5 \pm 5$  para el control vs.  $139 \pm 5$  para exosomas  $10 \text{ ng}/\mu\text{l}$  ( $p= 0,8$ ). Radio máximo:  $101,5 \pm 3 \mu\text{m}$  para el control vs.  $103 \pm 3 \mu\text{m}$  para exosomas  $10 \text{ ng}/\mu\text{l}$  ( $p= 0,7$ ). Ramificaciones primarias (intersecciones primer radio)  $5,0 \pm 0,2$  para el control vs.  $5,3 \pm 0,2$  para exosomas  $10 \text{ ng}/\mu\text{l}$  ( $p= 0,4$ ). Ramificación máxima (máximo número de intersecciones):  $9,3 \pm 0,3$  para el control vs.  $9,3 \pm 0,3$  para exosomas  $10 \text{ ng}/\mu\text{l}$ . Valor crítico:  $24,1 \pm 0,6 \mu\text{m}$  para el control vs.  $23 \pm 0,6 \mu\text{m}$  para exosomas  $10 \text{ ng}/\mu\text{l}$  ( $p= 0,3$ ). Estos resultados muestran una respuesta diferencial a exosomas en ambos tipos celulares y abren nuevas interrogantes acerca del mecanismo que explica estas diferencias.

A.



B.

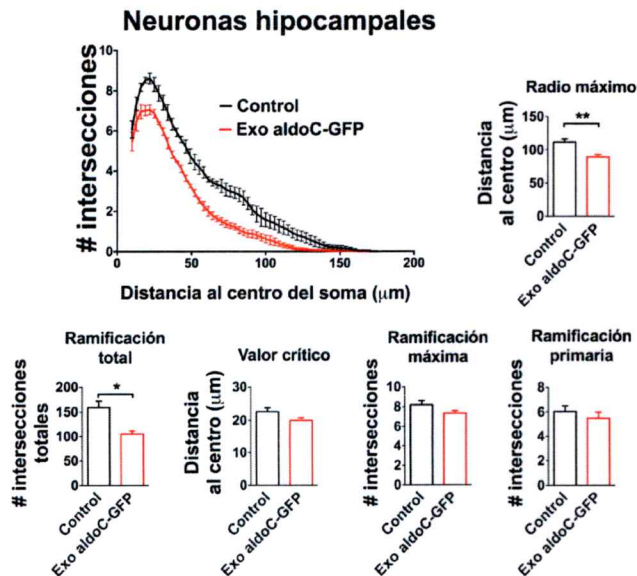


Figura 22. Exosomas derivados de astrocitos que sobre-expresan aldolasa C-GFP afectan la morfología de neuronas hipocampales, pero no corticales. Neuronas de 3 DIV fueron tratadas con 10 ng/ $\mu\text{l}$  de exosomas derivados de

astrocitos que sobre-expresan aldolasa C-GFP (curva roja) por 72 horas y teñidas contra MAP2 A/B. **A (Neuronas corticales) y B (Neuronas hipocampales)**. Los paneles superiores izquierdos muestran el número de intersecciones con círculos concéntricos de radio creciente con 3  $\mu\text{m}$  de separación en neuronas hipocampales o corticales. Las curvas control (negra) corresponden a neuronas del mismo cultivo, pero sin tratar con exosomas. En los gráficos de barra se muestran las cuantificaciones de los parámetros del análisis de Sholl. Todos los datos representan el promedio  $\pm$  error estándar de tres experimentos independientes (N= 3) donde se analizaron 30-50 células por condición de manera aleatoria. \* $p < 0,05$ . Prueba t de Student.

La disminución de MAP2 A/B inducida por miR-26a-5p en neuronas hipocampales y la incorporación de este miRNA mediante exosomas permite suponer que los exosomas de astrocitos son capaces de regular la morfología neuronal transfiriendo miR-26a-5p. Para determinar la contribución de miR-26a-5p a este efecto, evaluamos el efecto morfológico que tiene un oligonucleótido análogo de miR-26a-5p (mimic) sobre las neuronas hipocampales y corticales.

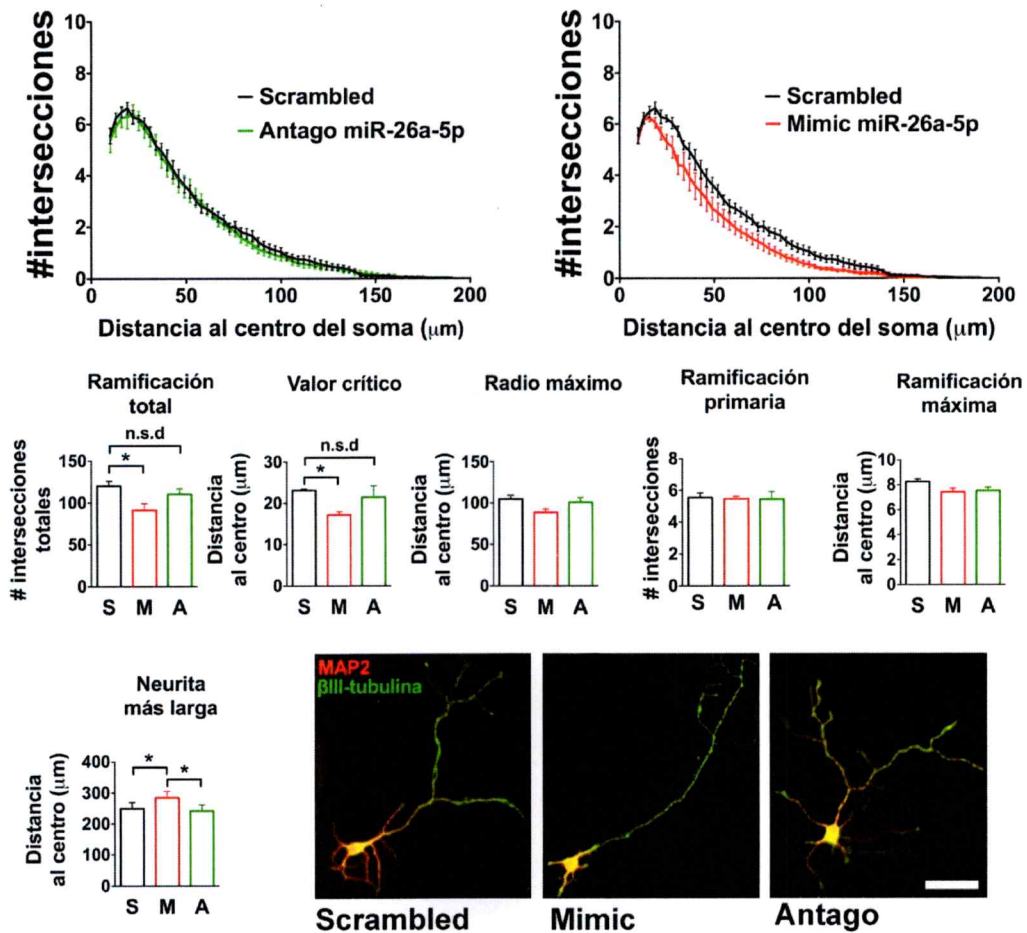
#### **X. Mimic de miR-26a-5p recapitula los efectos morfológicos inducidos por exosomas que contienen aldolasa C-GFP.**

Evaluamos el efecto del mimic de miR-26a-5p en la morfología dendrítica de neuronas hipocampales. Se compararon 3 condiciones experimentales: scrambled (oligonucleótido control), mimic y antago (inhibidor miR-26a-5p). La cuantificación de los parámetros se describe a continuación (figura 23):  
Ramificación total (número total de intersecciones):  $120 \pm 6$  para scrambled vs.  $91 \pm 8$  para el mimic ( $p = 0,02$ ) y  $110 \pm 7$  para el antago ( $p = 0,6$  vs. scrambled).  
Radio máximo:  $104 \pm 5 \mu\text{m}$  para scrambled vs.  $88 \pm 4 \mu\text{m}$  para el mimic ( $p = 0,06$ )

y  $100 \pm 6$  para el antago ( $p= 0,8$  vs. scrambled). Ramificaciones primarias (intersecciones primer radio):  $5,5 \pm 0,3$  para scrambled vs.  $5,5 \pm 0,2$  para mimic ( $p= 0,98$ ) y  $5,4 \pm 0,5$  para el antago ( $p= 0,99$  vs. scrambled). Ramificación máxima (máximo número de intersecciones):  $8,3 \pm 0,2$  para scrambled vs.  $7,4 \pm 0,3$  para el mimic ( $p= 0,09$ ) y  $7,5 \pm 0,3$  para el antago ( $p= 0,18$  vs. scrambled). Valor crítico:  $23 \pm 3 \mu\text{m}$  para scrambled vs.  $17,2 \pm 0,8 \mu\text{m}$  para el mimic ( $p= 0,03$ ) y  $21 \pm 3$  para el antago ( $p= 0,7$  vs. scrambled).

Además, medimos la neurita más larga mediante una tinción contra  $\beta$ III-tubulina, la cual tiñe tanto dendritas como axones. Los valores obtenidos fueron los siguientes:  $277 \pm 16$  para scrambled vs.  $330 \pm 14$  para el mimic ( $p= 0,04$ ) y  $303 \pm 33$  para el antago ( $p= 0,5$  vs. scrambled,  $p= 0,03$  vs. mimic). Cabe resaltar que el efecto de miR-26a-5p sobre el árbol dendrítico y el largo del axón es diferencial, lo cual es coherente con otros resultados en la literatura (ver discusión).

Este análisis muestra que el mimic de miR-26a-5p produce un cambio en la arborización dendrítica similar al de los exosomas que contienen aldolasa C-GFP, siendo los efectos más similares en la ramificación total (37% de disminución con exosomas vs. un 24% de disminución con mimic) y el valor crítico (23% de disminución con exosomas vs. un 27% de disminución con mimic).



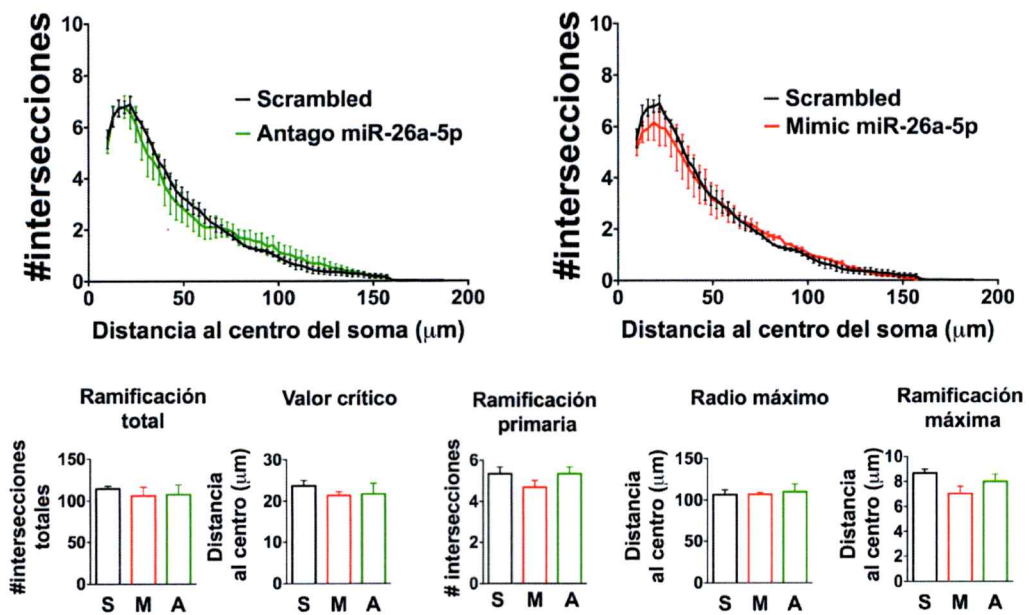
**Figura 23. Efectos morfológicos inducidos por mimic de miR-26a-5p en neuronas hipocampales.** Panel superior, número de intersecciones con círculos concéntricos de radio creciente ( $3 \mu\text{m}$ , análisis de Sholl) en neuronas hipocampales de 3 DIV transfectadas con  $10 \text{ pmol}$  ( $25 \text{ nM}$ ) totales de mimic miR-26a-5p (curva roja) o inhibidor de miR-26a-5p (antago, curva verde). La curva control (negra) corresponde a neuronas transfectadas con  $10 \text{ pmol}$  ( $25 \text{ nM}$ ) de un oligonucleótido sin blancos moleculares en mamíferos (scrambled del mimic). El resto de los gráficos muestra la cuantificación de los parámetros morfológicos que se indican para scrambled (S), mimic (M) y antago (A). En cada punto de las curvas y en los gráficos de barra se indica el promedio  $\pm$  error estándar de cinco experimentos independientes ( $N=5$ ), donde se analizaron 20-30 células por condición aleatoriamente, excepto para el parámetro neurita más larga en donde se analizaron 20-30 células desde tres experimentos independientes ( $N=3$ ).  $*p < 0,05$ . ANOVA de una vía no pareado y prueba post-hoc de Tukey, excepto para el parámetro neurita más larga donde se usó ANOVA de una vía pareado y

prueba post-hoc de Tukey. **Panel inferior**, imágenes epifluorescentes de tinción contra MAP2 A/B (rojo) y  $\beta$ III-tubulina (verde) representativas de los cambios morfológicos en las condiciones descritas anteriormente. Barra = 20  $\mu$ m.

Considerando que las neuronas corticales son refractarias al efecto de los exosomas, quisimos averiguar cuál es el efecto de la transfección directa de miR-26a-5p en la morfología dendrítica. Tal como se muestra en la figura 24, encontramos que, a diferencia de las neuronas hipocampales, miR-26a-5p no tiene un efecto estadísticamente significativo en ninguno de los parámetros morfológicos analizados en neuronas corticales. El valor de los parámetros se describe a continuación. Ramificación total (número total de intersecciones):  $114 \pm 3$  para scrambled vs.  $106 \pm 10$  para el mimic ( $p=0,7$ ) y  $107 \pm 12$  para el antago ( $p=0,8$  vs. scrambled). Radio máximo:  $106 \pm 6 \mu$ m para scrambled vs.  $106 \pm 2 \mu$ m para el mimic ( $p=0,98$ ) y  $109 \pm 10$  para el antago ( $p=0,93$  vs. scrambled). Ramificaciones primarias (intersecciones primer radio):  $5,3 \pm 0,3$  para scrambled vs.  $4,7 \pm 0,3$  para mimic ( $p=0,3$ ) y  $5,3 \pm 0,3$  para el antago ( $p=0,8$  vs. scrambled). Ramificación máxima (máximo número de intersecciones):  $8,7 \pm 0,3$  para scrambled vs.  $7,0 \pm 0,6$  para el mimic ( $p=0,07$ ) y  $8,0 \pm 0,6$  para el antago ( $p=0,6$  vs. scrambled). Valor crítico:  $24 \pm 1 \mu$ m para scrambled vs.  $21,3 \pm 0,9 \mu$ m para el mimic ( $p=0,44$ ) y  $22 \pm 3$  para el antago ( $p=0,53$  vs. scrambled). Estos resultados sugieren que la respuesta diferencial a los exosomas en ambos tipos celulares, podría explicarse por un mecanismo de respuesta alternativo a miR-26a-5p existente en neuronas corticales. Esto se complementa muy bien con el resultado expuesto que en la figura 16, donde observamos que la disminución de MAP2



A/B ocurre solamente en neuronas hipocámpales, al menos tras el tiempo utilizado para efectuar los análisis morfológicos (luego de 72 horas). Las posibles explicaciones para esta respuesta diferencial de las neuronas corticales a miR-26a-5p, serán abordadas en la discusión.



**Figura 24. Efectos morfológicos inducidos por mimic de miR-26a-5p en neuronas corticales.** Cuantificación de los parámetros morfológicos que se indican a partir del número de intersecciones con círculos concéntricos de radio creciente (3 μm, análisis de Sholl) en neuronas hipocámpales de 3 DIV transfectadas con 10 pmol (25 nM) de mimic miR-26a-5p (M) o inhibidor de miR-26a-5p (A). Los gráficos en negro corresponden a neuronas transfectadas con 10 pmol (25 nM) de un oligonucleótido sin blancos moleculares en mamíferos (S). Se indica el promedio ± error estándar de tres experimentos independientes (N=3), donde se analizaron 35 células por condición.

Estos resultados sugieren que miR-26a-5p es clave para explicar los cambios morfológicos inducidos por exosomas aldolasa C-GFP en neuronas

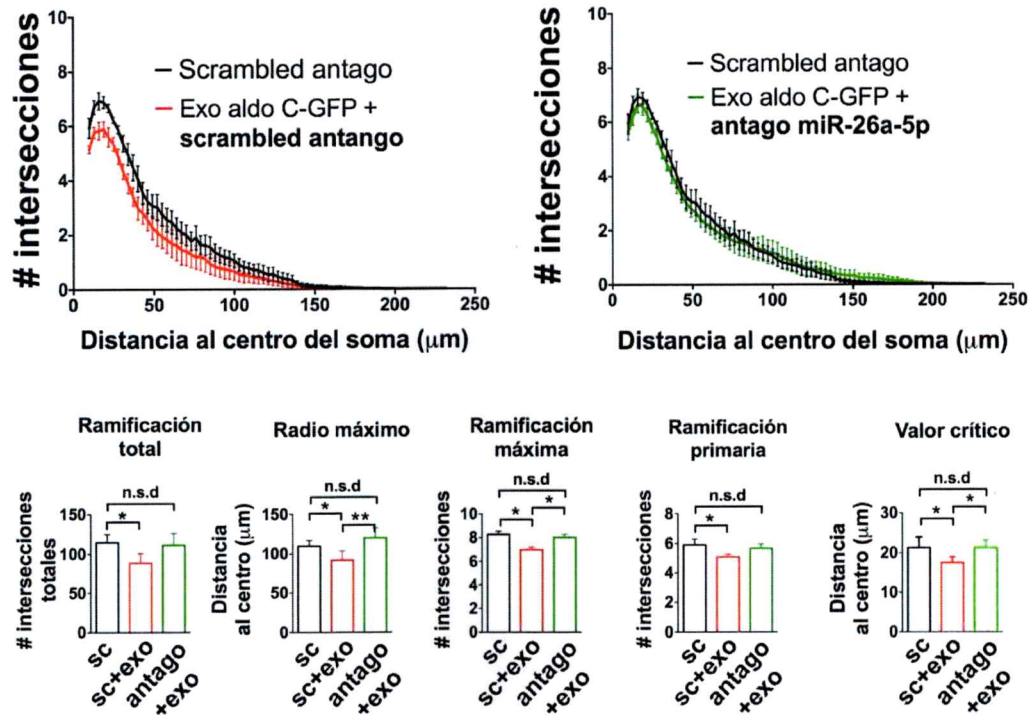
hipocampales. Por lo tanto, quisimos averiguar si la inhibición de miR-26a-5p en neuronas tratadas con exosomas es capaz de prevenir su efecto.

#### **XI. La inhibición previa de miR-26a-5p en neuronas bloquea los efectos morfológicos inducidos por exosomas de astrocitos que sobre-expresan aldolasa C-GFP.**

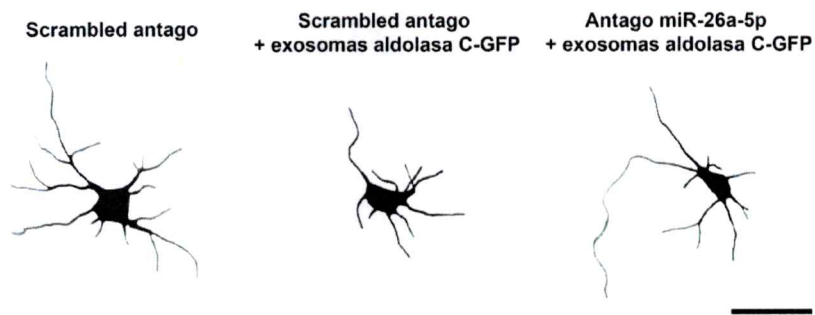
Averiguamos si los efectos inducidos por exosomas son abolidos si es que previamente se inhibe miR-26a-5p en neuronas. Para lograrlo, transfectamos neuronas hipocampales de 3 DIV con un inhibidor de miR-26a-5p (antago) y luego las estimulamos por 72 horas con 10 ng/ $\mu$ l de exosomas de astrocitos que sobre-expresan aldolasa C-GFP. Tal como se resume en la figura 25 A y B, encontramos los siguientes valores para los parámetros morfológicos. Ramificación total: 115  $\pm$  10 para scrambled vs. 88  $\pm$  12 para scrambled más exosomas ( $p= 0,03$ ) y 111  $\pm$  15 para antago más exosomas ( $p= 0,05$  vs. scrambled más exosomas). Radio máximo 103  $\pm$  8 para scrambled vs. 85  $\pm$  11 para scrambled más exosomas ( $p= 0,04$ ) y 109  $\pm$  14 para antago más exosomas ( $p=0,03$  vs. scrambled más exosomas). Ramificaciones primarias 5,9  $\pm$  0,4 para scrambled vs. 5,0  $\pm$  0,2 para scrambled más exosomas ( $p= 0,03$ ) y 5,6  $\pm$  0,3 para antago más exosomas ( $p= 0,1$  vs. scrambled más exosomas). Ramificación máxima: 8,3  $\pm$  0,3 para scrambled vs. 7,0  $\pm$  0,2 para scrambled más exosomas ( $p= 0,02$ ) y 8,0  $\pm$  0,3 para antago más exosomas ( $p= 0,045$  vs. scrambled más exosomas). Valor crítico: 21  $\pm$  3 para scrambled vs. 17  $\pm$  1,4 para scrambled más exosomas ( $p= 0,04$ ) y 21  $\pm$  2 para antago más exosomas ( $p= 0,045$  vs. scrambled

más exosomas). Estos resultados muestran que la transfección previa de neuronas con el inhibidor de miR-26a-5p bloquea la disminución inducida por exosomas en cada uno de los parámetros morfológicos analizados. Esto confirma la suposición de que miR-26a-5p es el responsable de los efectos morfológicos inducidos por exosomas y del efecto diferencial de los exosomas de astrocitos que sobre-expresan aldolasa C-GFP, puesto que contienen más miR-26a-5p que los de astrocitos control (GFP).

A.



B.



**Figura 25. Inhibición de miR-26a-5p bloquea los efectos morfológicos de exosomas de astrocitos que sobre-expresan aldolasa C-GFP.** A Panel superior: Número de intersecciones con círculos concéntricos de radio creciente de 3  $\mu\text{m}$  en neuronas hipocámpicas de 3 DIV teñidas contra MAP2 A/B posterior a 72 horas de incubación con 10 ng/ $\mu\text{l}$  de exosomas derivados de astrocitos que sobre-expresan aldolasa C-GFP, previamente transfectadas con un inhibidor de miR-26a-5p (antago, verde) y el respectivo control negativo o scrambled (Sc,

rojo). **Panel inferior**, gráficos representativos de los parámetros obtenidos en el análisis de Sholl en tres experimentos independientes que fueron hechos en paralelo para cada condición, escogiendo a lo menos 30-50 células por de manera aleatoria en cuatro experimentos independientes. \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ . ANOVA de una vía pareado y prueba post-hoc de Tukey. **B.** Imágenes representativas de los cambios observados en tinción contra MAP2 A/B. Barra= 100  $\mu\text{m}$ .

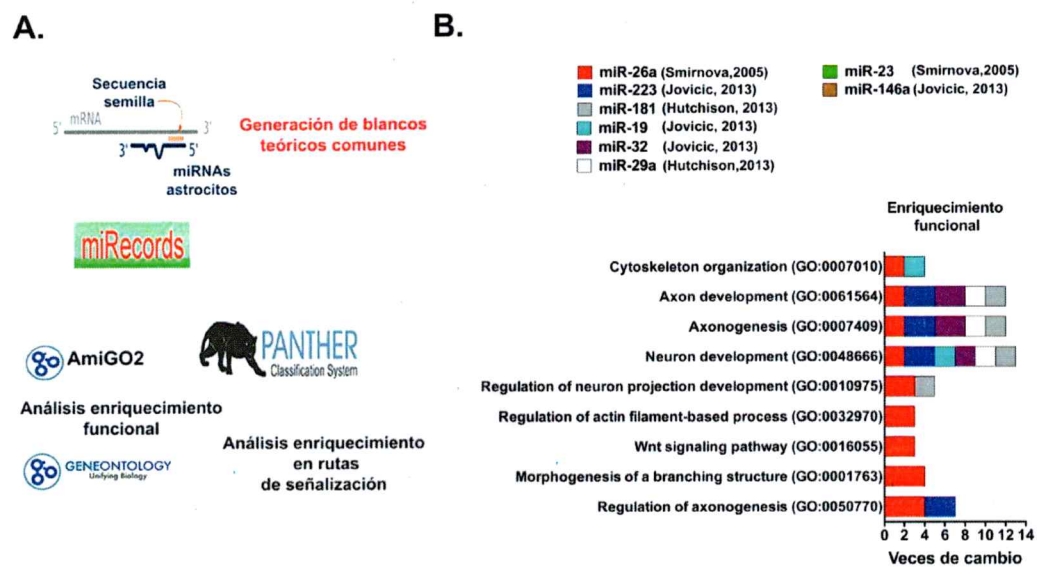
Es interesante destacar que para miR26a-5p, además de los blancos mencionados en la tabla 1, existen otros blancos, predichos *in silico* (aún no necesariamente comprobados experimentalmente) que tienen funciones relacionadas con el citoesqueleto neuronal y la vía Wnt. De esta manera, una búsqueda *in silico* de los blancos de miR26a-5p podría ser clave para entender mejor sus efectos sobre la fisiología de neuronas y otras células. Para ello realizamos un análisis *in silico* exhaustivo de los blancos de miR-26a-5p.

## **XII. Genes potencialmente regulados por miR-26a-5p tienen preferencia por procesos biológicos relacionados con la citoarquitectura neuronal y la vía Wnt.**

Usando la plataforma miRECORDS (<http://tinyurl.com/js9jr8n>) pudimos encontrar los blancos teóricos de miR-26a-5p en humanos a partir de la consulta de 11 programas que usan diferentes algoritmos de predicción, éstos son: DIANA-microT, MicroInspector, miRanda, MirTarget2, miTarget, NBmiRTar, PicTar, PITA, RNA22, RNAhybrid y TargetScan/TargetScanS. Seleccionamos solamente los genes predichos comunes a 4 o más bases de datos. Con ello obtuvimos una lista de 863 genes que se incorporaron en la herramienta de

enriquecimiento funcional en procesos biológicos de la plataforma AmiGO2 (<http://tinyurl.com/z2pn5hb>). Por otro lado, esta lista de genes fue cargada en la plataforma PANTHER (<http://tinyurl.com/hvmdtun>) para realizar un análisis de enriquecimiento en rutas de señalización (panther pathways), lo que se esquematiza en la figura 26 A. A partir de este protocolo, seleccionamos algunos procesos biológicos de miR-26a-5p, relevantes para la morfología neuronal, citoesqueleto y la vía Wnt. Luego, comparamos este resultado con otros miRNAs que, por literatura, han sido descritos como enriquecidos en astrocitos (Smirnova y cols., 2005); (Jovičić y cols., 2013); (van Spronsen y cols., 2013). Como se muestra en la figura 26 B, encontramos que miR-26a-5p está involucrado preferentemente con procesos biológicos relacionados con la regulación de la morfología neuronal. Sin embargo, llama la atención que en los procesos biológicos de la vía Wnt; regulación de procesos basados en filamentos de actina y morfogénesis de una estructura ramificada, miR-26a-5p es el único miRNA de origen astrocítico implicado. Basados en esta pequeña muestra de miRNAs astrocíticos, este resultado nos lleva a suponer que miR-26a-5p sería clave para regular la morfología neuronal y los elementos de la vía Wnt. Este hallazgo para miR-26a-5p es interesante puesto que se ha reportado que los miRNAs en general no regulan genes al azar, sino que aquellos funcionalmente relacionados de forma más directa (Hausser y Zavolan, 2014; Krishnan y cols., 2013). Así, miR-26a-5p podría ser un miRNA con preferencia por la regulación de funciones asociadas al citoesqueleto y la morfología celular.

Además, mediante la plataforma PANTHER pathways, se buscó dentro los genes regulados por miR-26a-5p, la presencia en diferentes rutas de señalización descritas en la plataforma (hasta el momento son 177). Dentro de ellas, solamente 3 se enriquecieron de forma estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Tal como se muestra en la figura 27, las rutas reguladas por miR-26a-5p son: Wnt, Integrina y la del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Las implicancias de estas vías de señalización en la morfología neuronal, y diversas enfermedades neurológicas, serán comentadas en la discusión.



**Figura 26. Blancos predichos para miR-26a-5p muestran preferencia por funciones asociadas a morfología neuronal, citoesqueleto y la vía Wnt respecto de otros miRNAs enriquecidos en astrocitos. A.** Esquema general del análisis. Los blancos para el microRNA se seleccionan desde el programa miRecords. Los genes predichos son comunes a lo menos con 4 algoritmos asociados a esta plataforma. La lista de genes regulados se analiza en la plataforma AmiGO2, o bien, en la base de datos de rutas de señalización de la plataforma PANTHER. **B.** Comparación de las funciones (Gene ontology) enriquecidas y asociadas a morfología neuronal, citoesqueleto y vía Wnt de los genes regulados por miR-26a-5p con otros miRNAs que también han sido

reportados como exclusivos o enriquecidos en astrocitos. Se grafican las veces de cambio (enriquecimiento) de los genes asociados a una función respecto del valor esperado para el genoma humano de referencia. El tamaño de las cajas coloreadas es proporcional a las veces de cambio en que se enriquece el proceso biológico. Se indican solamente las funciones con un valor  $p < 0,05$ . Prueba de Bonferroni ajustada de estadística binomial.

| Rutas PANTHER                        | REFLIST (20814) | Regulados (689) | Esperado | Cambio | Razón | Valor P  |
|--------------------------------------|-----------------|-----------------|----------|--------|-------|----------|
| Ruta señalización PDGF (P00047)      | 138             | 14              | 4.57     | +      | 3.06  | 4.23E-02 |
| Ruta señalización Integrina (P00034) | 181             | 18              | 5.99     | +      | 3.00  | 7.79E-03 |
| Ruta señalización Wnt (P00057)       | 309             | 26              | 10.23    | +      | 2.54  | 3.30E-03 |
| Sin clasificar                       | 18255           | 559             | 604.29   | -      | .93   | 0.00E00  |

**Figura 27. Análisis de enriquecimiento de las rutas de señalización potencialmente reguladas por miR-26a-5p.** Análisis *in silico* de los genes regulados por miR-26a-5p en plataforma PANTHER. Se indica el número de genes que están presentes en la ruta de señalización definida por la plataforma (columna Rutas PANTHER) que son regulados por miR-26a-5p; el número de genes esperado corresponde a los genes que deberían estar regulados según el tamaño de la muestra analizada (689), teniendo como referencia los genes del genoma humano (REFLIST 20814) que están presentes en la ruta. El enriquecimiento de la ruta (Razón) corresponde al cociente entre los genes regulados y los genes esperados. Se indica solamente las rutas con un valor  $p < 0,05$ . Prueba de Bonferroni ajustada de estadística binomial.



## DISCUSIÓN

En este trabajo de tesis se encontró que aldolasa C está contenida en exosomas que son secretados desde astrocitos, los cuales son capaces de internalizarse y transferir esta enzima, tanto a neuronas corticales como hipocampales. Además, encontramos que aldolasa C está presente en exosomas obtenidos desde LCR *in vivo* y que su contenido aumenta luego de un protocolo de estrés por restricción de movimiento. Para determinar el efecto que tendrían los exosomas portadores de aldolasa C en neuronas, sobre-expresamos aldolasa C en astrocitos en cultivo para aislar exosomas enriquecidos en esta enzima. Encontramos que estas vesículas inducen una disminución en el crecimiento de procesos dendríticos selectivamente en neuronas hipocampales de manera dependiente de miR-26a-5p. Estos resultados reproducen la mayor susceptibilidad del tejido hipocampal descrita frente a los efectos deletéreos del estrés sobre la morfología dendrítica. A continuación se discutirán los aspectos más relevantes de estos resultados.

### **I. Pureza de la fracción exosomal.**

A pesar de que se sabe que todos los tipos celulares secretan exosomas, su liberación desde astrocitos ha sido escasamente estudiada, así como también es exigua la información sobre un posible efecto en neuronas. Las nano-vesículas extracelulares (o exosomas) y que se originan en la ruta endocítica, precipitan al ultracentrifugar a 100.000 g y además, flotan en densidades entre 1,11 y 1,19 g/ml. Sin embargo, actualmente se sabe que esta fracción es

altamente heterogénea y está compuesta por subpoblaciones, que difieren en su actividad biológica (Kowal y cols., 2016). Considerando los resultados de esta tesis, sería interesante separar estas sub-poblaciones, cuestión que se podría lograr mediante flotación en gradientes de densidad o separación por tamaño (filtraciones cromatográficas por geles o membranas porosas, por ejemplo). Estas estrategias habrían permitido una mejor caracterización de los exosomas responsables de la actividad biológica que nosotros reportamos (es decir, menor crecimiento de árbol dendrítico en neuronas).

En cuanto a la presencia de marcadores proteicos, nuestros exosomas cumplieron los criterios aceptados para estas preparaciones en buena parte de la literatura. Sin embargo, hay que considerar que no existen marcadores selectivamente presentes con respecto a otro tipo de vesículas extracelulares, ya que ninguna de estas proteínas se expresa exclusivamente en vesículas intraluminales de los CMVs. Tampoco la fracción de exosomas contiene mayores niveles de estas proteínas "marcadoras" si se compara con lisado total de células, es decir, no hay enriquecimiento, cuestión que fue comprobada también por nosotros (Théry y cols., 2006). Aún cuando proteínas como CD63 o CD81 se enriquecen de forma clara en vesículas intraluminales (Escola y cols., 1998), varios trabajos muestran que su enriquecimiento en exosomas es variable. Además, exosomas de un mismo tipo celular cambian la proporción en el contenido ciertos marcadores, como CD63 y HSP70, cuando se elimina sintenina (proteína que participa en la génesis de CMVs) (Baletti y cols., 2012). Por otro

lado, en algunos tipos de exosomas es posible encontrar presencia de proteínas de CMVs/lisosomas como LAMP-1 y LAMP-2, mientras que en otros están ausentes (Théry y cols., 2006). De esta manera, se acepta actualmente que los niveles de cada uno de los denominados “marcadores proteicos” dependen del tipo celular y del contexto de la célula que los produce. En ese sentido, marcadores anteriormente utilizados, como flotilina 1 y HSP70, están presentes en niveles similares en otros tipos de VEs de forma que no sirven para discriminar entre sub-poblaciones (Kowal y cols., 2014). Nosotros encontramos que, en nuestra fracción exosomal, el único marcador que tiende a enriquecerse respecto del homogenizado es CD63, y además, es el marcador menos variable entre ambos tipos de cultivos utilizados en este trabajo, es decir, cultivo de astrocitos puros y neuronal mixto. En un reciente trabajo del grupo de Théry, se propone que CD63 está específicamente enriquecida en exosomas cuando se compara con otros tipos de EVs, y que constituiría hasta ahora el mejor marcador en cuanto a especificidad de vesículas con mayor proporción de componentes derivados de la ruta endocítica, con la salvedad de que algunos tipos celulares producen exosomas que no expresan CD63 (Kowal y cols., 2016).

Para separar poblaciones de EVs de agregados proteicos u otras partículas contaminantes utilizamos gradientes continuos de sacarosa. En ellas, nosotros observamos que fracciones positivas para CD63 y TSG101 flotan a densidades compatibles con las descritas para exosomas (Théry y cols., 2002). Estas mismas fracciones también contienen aldolasa C. La presencia de estas

proteínas a densidades superiores a 1,19 g/ml podría deberse a agregados de vesículas. Alternativamente, esta fracción podría corresponder a vesículas extracelulares de mayor densidad, como también ha sido observado en otros trabajos (Colombo y cols., 2014). Por último, la presencia de marcadores de exosomas a densidades mayores podría depender de ciertas condiciones experimentales: por ejemplo, no sabemos si la cantidad de exosomas (medida como por cantidad de proteínas) y el tampón utilizado, son óptimos para favorecer la desagregación de las vesículas. Al respecto, es importante mencionar que, a lo menos en dos experimentos no mostrados, hemos observado que aldolasa C se detecta sólo en las densidades descritas para exosomas. De manera que, si bien la gradiente de densidad no prueba que aldolasa C está exclusivamente asociada a exosomas, sí muestra que:

- La mayor parte de la fracción está asociada a vesículas, puesto que se sabe que los agregados proteicos quedan en el fondo de la gradiente, mientras que las vesículas flotan (Colombo y cols., 2014).

- La mayor parte de la enzima presente en la fracción estaría en el lumen de las vesículas como lo muestra nuestro ensayo de protección a proteasas.

Al medir el diámetro de exosomas por dos metodologías diferentes, Nano Tracking Analysis (NTA) y microscopía electrónica, encontramos que por microscopía el tamaño promedio es compatible con lo reportado previamente (Wang y cols., 2011). En cambio, su diámetro es mayor cuando se utiliza el NTA,

lo que se explica porque, en general, NTA tiende a sobre-estimar el tamaño de las vesículas respecto de microscopía electrónica (Sokolova y cols., 2011). NTA determina el coeficiente de difusión de las partículas siguiéndolas para obtener el desplazamiento cuadrático medio, mediante un sistema que sigue y registra la refracción de las partículas en solución iluminadas con una longitud de onda fija dentro del rango de 400-700 nm. Sin embargo, al ser un método que usa luz del espectro visible, el límite de resolución es también cercano a 200 nm, de manera que, por un lado, no podemos saber si lo que se mide corresponde a una o varias vesículas aglomeradas, lo que aumentaría el radio hidrodinámico, entregando un tamaño mayor de partícula. También, el tamaño aumenta artificialmente por presencia extra-vesicular de agregados proteicos, lo cual incide en las mediciones y calibración del equipo. A pesar de lo anterior, ninguno de los dos métodos muestra presencia significativa de vesículas mayores a 500nm. Esto apoya la idea de que aldolasa C está presente en una fracción de vesículas de tamaño, densidad y composición compatible con exosomas.

## **II. Incorporación de exosomas a neuronas.**

Una de las críticas habituales en los experimentos con exosomas es que se desconocen las dosis a las cuales están expuestas las células blanco en situaciones fisiológicas. Nosotros agregamos 8 µg de proteína a 30.000 células, lo que equivale a 0,27 ng por célula, lo cual es similar a lo utilizado en otros trabajos (Svensson y cols., 2013; Montecalvo y cols., 2012). Para un cálculo aproximado de la cantidad de vesículas contenidas en 0,27 ng, a partir del

análisis de NTA, consideramos la moda como el valor representativo de la cantidad de exosomas con las correspondientes correcciones de dilución. Este cálculo arrojó que por cada nanogramo de proteínas en exosomas de astrocitos hay  $0,36 \times 10^6$  vesículas. Este valor es similar al obtenido mediante un cálculo teórico realizado por Sverdlov, quien asume que la masa y volumen de un exosoma debería ser  $1 \times 10^{-6}$  veces el volumen de una célula, presuponiendo forma esférica para ambos y que la masa de proteínas de una célula es 0,5 ng la cual se distribuye uniformemente (Sverdlov., 2012). Así, Sverdlov obtiene un valor de  $2 \times 10^6$  vesículas por nanogramos de proteínas en exosomas.

Según los cálculos anteriores, cada neurona recibiría 48.600 exosomas de astrocitos. Al respecto, se ha estimado que la línea celular RBL-2H3 contiene cerca de 3000 VILs, lo cual correspondería al límite superior de liberación de exosomas por una sola célula en cualquier momento (Sverdlov., 2012). Si suponemos el mismo límite para astrocitos, si los exosomas se internalizaran completamente, cada neurona requeriría la secreción de a lo menos 16 astrocitos ( $48.600/3000$ ) para reproducir los efectos analizados. Hay que considerar que usamos una dosis aguda de exosomas que se distribuyen en el platillo de cultivo, por lo que una parte de los exosomas nunca interactuará con la célula blanco. Sería más fisiológico administrar una menor dosis de exosomas por un tiempo prolongado mediante un sistema de flujo sostenido, pero por la cantidad de vesículas requeridas para un experimento de esa naturaleza es un experimento difícil de implementar. También desconocemos si el medio extracelular es capaz

de degradar o eliminar exosomas. En este sentido, tal como lo discute Sverdlov, queda mucho por hacer en el campo de estudio de las vesículas extracelulares en términos de utilizar parámetros más cuantitativos y relaciones estequiométricas de los exosomas y sus componentes.

Existen pocos trabajos que estudien internalización de exosomas en neuronas, donde mencionan solamente el número total de partículas usadas medidas por NTA (Frühbeis y cols., 2013), o bien, el volumen y número de células desde las cuales obtienen los exosomas (Chivet y cols., 2014), pero no mencionan la cantidad total de proteínas en la muestra. Por ejemplo, Frühbeis describe que utiliza 6000 exosomas de oligodendrocitos por neurona para ver efectos funcionales, mientras que Chivet estudia la internalización de exosomas provenientes de  $6,5 \times 10^6$  neuronas corticales. Sin embargo, la cantidad de exosomas obtenidas por medio de cultivo varía, como nosotros lo mostramos, según el tiempo que se usa para recoger el medio de cultivo, según la condición experimental del cultivo y según la metodología de aislamiento. Incluso, hemos observado que diferencias técnicas en aspiración del sobrenadante después de la ultracentrifugación produce grandes diferencias en el rendimiento de exosomas.

Nosotros analizamos la incorporación de exosomas mediante la tinción contra GFP, lo cual probablemente corresponde a una sub-población del total de exosomas producidos por astrocitos. Para tener una idea del total de exosomas

incorporados, podríamos complementar este experimento tiñendo el total de las vesículas con una sonda lipídica fluorescente como PKH6.

### **III. Efecto de la sobre-expresión de aldolasa C-GFP y su destinación a exosomas.**

Al aislar los exosomas de cultivos transfectados, es interesante notar que contienen mayor cantidad de enzima recombinante que endógena. Esto podría explicarse porque la enzima endógena es relativamente escasa en exosomas, pudiendo llegar a representar cerca de un 5% respecto del nivel total en homogenizados, de manera que la sobre-expresión de aldolasa C-GFP podría aumentar la destinación a la fracción exosomal. Otra posibilidad es que GFP induzca una mayor destinación de la enzima a exosomas. Sin embargo, nosotros no hemos sido capaces de detectar GFP en exosomas de astrocitos que sobre-expresan GFP, es decir, GFP por sí solo, no es destinado a exosomas. Esta misma situación fue observada por otros grupos (Mittelbrunn y cols., 2011; Montecalvo y cols., 2012). Por lo tanto, concluimos que la aldolasa C-GFP presente en exosomas de astrocitos podría potenciar la función biológica de la enzima endógena en estas vesículas.

### **IV. Potencial relevancia de la presencia de aldolasa C en exosomas *in vivo*.**

Aldolasa C es una enzima de la vía glicolítica, por lo que fue sorprendente encontrarla en exosomas aunque previamente ya se había observado que se enriquece en el medio de cultivo de astrocitos (Lafon-Cazal y cols., 2003).



Nuestros resultados son concordantes con el hallazgo de otras proteínas glicolíticas en exosomas aunque hasta ahora no se ha intentado esclarecer la función de estas vesículas (Basso y Bonetto, 2016) .

Finalmente, para trasladar este hallazgo a una situación *in vivo*, aislamos exosomas desde LCR de ratas, pudiendo detectar aldolasa C en ellos. Además, como nuestro laboratorio había reportado mayores niveles totales de aldolasa C en LCR de ratas sometidas a estrés (Ampuero y cols., 2015), en esta tesis ampliamos este hallazgo al describir su presencia aumentada en exosomas frente a estas condiciones. De forma coherente con un mecanismo de adaptación al estrés, encontramos que la estimulación de astrocitos con corticosterona, aumenta el contenido de aldolasa C-GFP en exosomas luego de 24 horas de estimulación. Además, luego de una hora de estimulación, corticosterona induce la transferencia de aldolasa C-GFP a somas neuronales en co-cultivo con astrocitos previamente electroporados. Esto sugiere que el aumento de los niveles de corticosterona clásicamente asociados al estrés puede estar generando la señalización mediada por exosomas portadores de aldolasa C.

Los resultados anteriores, sin embargo, no demuestran que la transferencia de la enzima sea mediada exclusivamente por exosomas, pues vesículas extracelulares, de tipo ectosomas eventualmente podrían incorporarse en neuronas (Proia y cols., 2008). Para averiguar si los exosomas son responsables del traspaso de esta enzima sería útil generar astrocitos que expresen aldolasa C-GFP, inhibiendo la expresión de proteínas G monoméricas

potencialmente implicadas en la liberación de exosomas desde astrocitos, tales como Rab35, Rab27 o Rab7 (Pfeffer., 2010; Colombo y cols., 2014). Otra estrategia es inhibir farmacológicamente la esfingomielinasa neutra, o disminuir su nivel de expresión, ya que está implicada en la biogénesis de exosomas dependiente de ceramida. Así, la liberación de exosomas se vería inhibida mientras que otros tipos de vesículas extracelulares que se originan directamente desde la membrana plasmática no se verían afectados.

El aumento de la transferencia de aldolasa C a neuronas inducido por corticosterona se podría deber a una mayor destinación de la enzima a los CMVs. Por lo tanto, el aumento de la fusión de cierta población de CMVs con mayor contenido de aldolasa C, podría explicar el aumento de aldolasa C en la fracción exosomal. Hasta el momento, desconocemos el origen de esta inducción, Al respecto, datos del Laboratorio de Neurociencias de La Universidad de Los Andes muestran que la estimulación de astrocitos con corticosterona 1 $\mu$ M por 24 horas, induce un aumento en el contenido total de aldolasa C (no mostrados). El aumento rápido observado en la transferencia de aldolasa C a neuronas luego de una hora de estimulación podría reflejar una mayor tasa de liberación total de vesículas, y no necesariamente, un aumento exclusivo de aldolasa C dentro de esta fracción. En general, cualquier factor que aumente localmente los niveles de calcio puede inducir mayor liberación de exosomas (Lachenal y cols., 2011; Ekström y cols., 2014; Savina y cols., 2003). En ese sentido, corticosterona es

capaz de aumentar la velocidad de las ondas de calcio en astrocitos (Zeng y cols., 2013; Chatterjee y Sikdar., 2013).

#### **V. Enriquecimiento de miR-26a-5p en astrocitos, respecto de neuronas.**

En la literatura, ha sido reportado que miR-26a está enriquecido en astrocitos comparado con neuronas (Smirnova y cols., 2005; Kye y cols., 2007). Incluso, Kye y cols., discute que en los primeros 3 días de cultivo de neuronas sin glías, miR-26a junto con otros RNAs asociados a astrocitos, está virtualmente ausente. Sin embargo, en etapas más tardías del cultivo (21 DIV), su contenido aumentaría debido a astrocitos que proliferaron lentamente. Nosotros comparamos por RT-PCR cuantitativo la expresión de mir-26a-5p en neuronas y astrocitos. Encontramos, en dos experimentos independientes, que en cultivos de astrocitos hay 10,4 veces más miR-26a-5p que en neuronas de 6 DIV (datos no mostrados) y que al incubar estas neuronas con exosomas de astrocitos, el contenido de miR-26a-5p aumenta cerca de un 27% luego de 3 horas de incubación. De esta manera, si bien las neuronas contienen cierto nivel basal de miR-26-a-5p, la incorporación de exosomas provenientes de astrocitos aumenta su contenido, lo que podría explicar las consecuencias funcionales descritas. Para desarrollar esta tesis, nos concentramos fundamentalmente en los blancos de la hebra 5p de miR-26a porque, en general, éstas son notablemente más abundantes en la célula (Huang y cols., 2014).

## **VI. Regulación del contenido de miR-26a-5p en exosomas por aldolasa C.**

Se ha descrito que existe una relación entre la maduración de miRNAs y proteínas de unión a RNAs. Así, se ha descrito una función antagónica de KSRP (proteína reguladora de corte y empalme tipo KH) y hnRNP A1 (ribonucleoproteína nuclear A1 heterogénea) en el procesamiento del pre-miRNA de let-7. En este trabajo, se muestra que ambas proteínas compiten por la unión a un loop del pre-miRNA y mientras que una favorece su procesamiento hacia la forma madura, la otra lo inhibe (Michlewski y Cáceres., 2010). Frente a esto, podemos especular que aldolasa C podría favorecer, tal vez por interacción directa, el procesamiento del pre-miRNA de miR-26a, aumentando la cantidad de ambas hebras maduras. En este sentido, existe evidencia de proteínas de unión a RNA que regulan la carga de ciertos miRNAs en exosomas (Villarroya-Beltri y cols., 2013; Melo y cols., 2014), apoyando la idea que aldolasa C, podría regular de forma directa o indirecta, el proceso de carga de miR-26a en estas vesículas.

Es interesante notar que la sobre-expresión de aldolasa C aumenta el contenido de la hebra 5p en exosomas, mientras que el efecto es opuesto para la hebra 3p. El cambio en la proporción de las hebras en exosomas puede tener consecuencias funcionales importantes dado que poseen distintos blancos moleculares.

Respecto de la posible unión de aldolasa C a RNAs, desconocemos si la presencia de GFP favorece o impide la interacción de aldolasa C con ácidos nucleicos u otros componentes. Para solucionar este problema podríamos

evaluar el efecto de la sobre-expresión de aldolasa C sin constructos adicionales, o bien usar marcas más pequeñas como c-myc o DDK, un trabajo que está actualmente en progreso.

## **VII. Implicancia de las funciones no-canónicas de aldolasa C.**

Además de la potencial unión a RNAs, las consecuencias de la sobre-expresión de aldolasa C en astrocitos pueden ser muy variadas. Tal como mencionamos en la introducción, aldolasa C podría interactuar con proteínas del citoesqueleto (Kao y cols., 1999; Kusakabe y cols., 1994; Volker y Knoll, 1997); modificar la distribución de vesículas acídicas dentro de la célula (Merkulova y cols., 2011) o regular los niveles de calcio intracelular por su capacidad de unión a inositol trifosfato IP<sub>3</sub> (Baron y cols., 1995, 1998). También, sería capaz de activar la vía Wnt canónica al formar un complejo con Axina (Caspi y cols., 2014). Respecto de todas las funciones no-canónicas asociadas a aldolasa C, es importante destacar que el flujo metabólico de la glicólisis no debería verse afectado por la sobre-expresión de aldolasa. Esto sucede porque la aldohidrólisis de fructosa 1,6- difosfato a dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y gliceraldehído-3-fosfato (GAP) es una reacción que en la célula está cercana al equilibrio (Berg y cols., 2002). Es más, existe evidencia de que, depletando el 80% de aldolasa B en células tumorales, el flujo metabólico no cambia significativamente, pero sí disminuye la proliferación celular. Luego, cuando sobre-expresan una aldolasa B catalíticamente muerta, la proliferación se recupera, de manera que el efecto observado es independiente de la glicólisis

(Lew y Tolan., 2012). Es posible que parte de los cambios asociados a funciones no glicolíticas de aldolasa B sean por sus propiedades de unión a ácidos nucleicos. Considerando que los miRNAs maduros son secuencias cortas, es probable que no solamente miR-26a-5p o 3p estén regulados por aldolasa C, sino otros miRNAs que guarden cierta identidad de secuencia. Sería muy interesante hacer un análisis de micro-array para analizar extensivamente los cambios inducidos por la sobre-expresión de la enzima en los exosomas de astrocitos.

#### **VIII. Regulación de la morfología de neuronas por exosomas derivados de astrocitos.**

De todos los parámetros morfológicos analizados, el cambio más pronunciado se observó en la ramificación total. Este parámetro es afectado por dos características: el largo de los procesos y su grado de ramificación. En este sentido, las neuronas tratadas con exosomas muestran tanto un menor crecimiento, reflejado en la disminución del radio máximo, como menor número de ramificaciones, efecto reflejado en parte por la ramificación máxima y ramificación primaria. El parámetro del radio máximo alcanzado por una neurona es un indicador de su extensión total, sin embargo, en algunas neuronas, este parámetro podría sub-estimar la extensión real de un proceso, pues éste podría tener una trayectoria curva.

Una posible explicación para la disminución en el valor crítico inducida tanto por exosomas de astrocitos que sobre-expresan aldolasa C-GFP, como por la transfección directa del mimic de miR-26a-5p, es el aumento en la inestabilidad

dinámica que produciría la disminución de todas las MAPs reguladas por este miRNA. Por ejemplo, hay evidencia de que la disminución de la proteína Tau, una MAP que estabiliza los microtúbulos en axón, genera axones más cortos y ramificados (Liu y cols., 2012). De manera análoga, la disminución de MAP2 producida por el mimic debería aumentar la inestabilidad dinámica, facilitando que los procesos se bifurquen a una distancia menor desde el soma, lo cual produce un valor crítico más pequeño.

En neuronas transfectadas con el mimic de miR-26a-5p también medimos el tamaño de la neurita más larga positiva para  $\beta$ III-tubulina. En oposición a lo descrito por nosotros, existen tres trabajos en los cuales se ha descrito que miR-26a-5p genera aumento en el árbol neurítico. En el primero de estos trabajos Li y Sun describen que su inhibición disminuye la arborización dendrítica en neuronas corticales de 7 DIV, mientras que el mimic la aumenta (Li y Sun., 2013). Las diferencias con nuestros resultados pueden radicar en la temporalidad del efecto, puesto que en este trabajo las neuronas se nucleofectaron antes de sembrarse en la placa y se analizaron luego de 7 DIV, mientras que nosotros transfectamos a los 3 DIV y analizamos la morfología a los 6 DIV. Adicionalmente, en este trabajo se analizaron tinciones contra  $\beta$ III-tubulina, por lo que el análisis podría corresponder tanto a axones como dendritas. En el segundo trabajo en discusión, se describe que miR-26a-5p es capaz de producir un aumento en el largo axónico luego de 24 horas de transfección del mimic en neuronas de 5 DIV (van Spronsen y cols., 2013), aunque tampoco analizan lo que sucede con la

arborización dendrítica. El tercer trabajo a discutir, es el de Jiang y cols., en donde se encontró que miR-26a-5p, a través de la disminución de GSK3 $\beta$ , es capaz de favorecer la regeneración axonal de nervios sensitivos periféricos en el contexto de una lesión con bupivacaína (Jiang y cols., 2015). Esto es compatible con nuestros resultados en neuronas hipocampales donde miR-26a-5p reduce la arborización de los procesos positivos para MAP2 A/B, mientras aumenta el largo de la neurita más larga positiva para  $\beta$ III-tubulina. En la literatura este fenómeno no es nuevo: así, en el trabajo de (Le Roux y Reh., 1994) se discute textualmente que: “el crecimiento axonal y dendrítico parece corresponder a eventos disociables y, al menos en parte, regulados de forma separada...”. De manera coherente con lo anterior (De Koninck y cols., 1993) encontró que el factor de crecimiento nervioso (NGF) induce un aumento en el crecimiento dendrítico, pero tiene poco efecto en el crecimiento del axón de neuronas sensoriales de ratas neonatas.

#### **IX. Participación de miR 26a-5p en los efectos morfológicos inducidos por exosomas derivados de astrocitos.**

Encontramos que miR 26a-5p es responsable de los efectos morfológicos de exosomas derivados de astrocitos, puesto que la transfección previa de las neuronas con el inhibidor de miR-26a-5p bloquea los cambios en cada uno de los parámetros morfológicos analizados. Considerando que el inhibidor de miR-26a-5p por sí solo no es capaz de inducir cambios estadísticamente significativos en los parámetros morfológicos, es razonable pensar que la función del antago-





miR en las neuronas tratadas con exosomas es fundamentalmente neutralizar el efecto de miR-26a-5p transferido mediante estas vesículas. Estos resultados son interesantes, puesto que siendo los exosomas estructuras biológicamente muy complejas, llama la atención que un solo miRNA, pueda explicar buena parte de los cambios morfológicos observados. Lo anterior pone de manifiesto la importancia que pueden tener los miRNAs, donde en ciertos contextos, serían los componentes claves en los fenómenos de interacción mediados por exosomas. Sin embargo, no se puede descartar que otros miRNAs presentes en los exosomas tengan blancos comunes, o bien, que sus efectos puedan converger en la reducción del crecimiento dendrítico. Por ejemplo, recientemente se describió que los exosomas de astrocitos transportan miR-19a (Zhang y cols., 2015), el cual de manera similar a miR-26a regula los niveles de PTEN y potencialmente de MAP2.

Respecto de la eficiencia de la transfección del mimic y antago, usando el inhibidor de miR-26a-5p marcado con una sonda fluorescente, observamos una transfección mayor al 90%, resultado similar al encontrado en otros trabajos para secuencias cortas de nucleótidos usando magnetofección (Pribyl y cols., 2014). Considerando que analizamos más de 100 células por condición, la probabilidad de que una neurona tratada con exosomas no haya incorporado el antago es de aproximadamente 10%.

## **X. Posibles mecanismos que median el efecto de miR-26a-5p sobre la morfología neuronal.**

Se ha encontrado correlación entre la expresión de MAP2 y la complejidad y largo de los procesos dendríticos en cultivos de neuronas disociadas desde distintas áreas cerebrales (Chamak y cols., 1987). Un efecto análogo al que se observa tras su depleción en macroneuronas cerebelares (Caceres y cols., 1992). Por lo tanto, es esperable que la disminución de MAP2, pueda producir una disminución en el largo y la complejidad del árbol dendrítico.

La proteína MAP2 previene la catástrofe (acortamiento) y promueve el rescate (elongación) de los filamentos de tubulina en el citoesqueleto neuronal (Pryer y cols., 1992). Mientras que en neuronas maduras MAP2 se expresa fundamentalmente en dendritas, en axón la función de estabilizar microtúbulos la cumple Tau. En las primeras horas del cultivo neuronal se inicia la polarización (distinción entre compartimento axónico y dendrítico), donde una o dos neuritas comienzan a crecer más rápido formando una de ellas el futuro axón, la cual posee más Tau y menos MAP2, mientras las dendritas poseen progresivamente menos Tau y más MAP2 (Kosik y Finch, 1987; Dotti y cols., 1988). En los primeros días en cultivo, la distinción entre los compartimentos axo-dendríticos aumenta progresivamente hasta hacerse clara el día 15, cuando la neurona presenta características morfológicas y funcionales plenamente maduras. Sin embargo, frecuentemente ya a las 24 horas *in vitro*, es posible distinguir el axón, considerando su longitud mucho mayor al resto de las neuritas y disminución

relativa de marca para MAP2 (van Spronsen y cols., 2013). Luego de 72 horas en cultivo, las dendritas aumentan notablemente su velocidad de crecimiento. Es importante destacar que al estimular con exosomas en esta etapa, nuestros resultados muestran el efecto de los exosomas en el estadio de mayor tasa de crecimiento dendrítico (Dotti y cols., 1988). Al analizar tinciones contra MAP2 A/B, nuestro análisis refleja cambios fundamentalmente en lo que posteriormente será el árbol dendrítico de la neurona, aunque en esta etapa del cultivo cierta porción del axón es positiva para esta proteína (Van Spronsen y cols., 2013; Dotti y cols., 1988). Un adecuado equilibrio entre la estabilización y desestabilización de los filamentos de tubulina, mediante MAP2 y Tau (entre otros), son claves para regular la extensión y ramificación de los procesos neuronales con consecuencias relevantes sobre la plasticidad sináptica o regeneración axónica en respuesta a daño (Dubey y cols., 2015).

Aparte de MAP 2 A/B, entre los blancos predichos para miR-26a-5p se encuentra MAP1A, MAP1B, MAP7 y MAP9, aunque estas últimas dos proteínas son fundamentalmente no-neuronales (Cassimeris y Spittle, 2001).

Se ha descrito que las proteínas de unión a microtúbulos (preferentemente MAP1, MAP2 y MAP4) participan, además, en la estabilización de la interacción de microtúbulos con filamentos de actina (Mohan y John, 2015), de modo que parecen cruciales para entender la morfología neuronal. Al respecto, MAP1B ha mostrado tener efectos sobre neuronas tanto morfológicamente maduras como inmaduras (Tortosa y cols., 2011; Scales y cols., 2009). Por ejemplo, la depleción

de esta proteína es capaz de inducir acortamiento del axón, a la vez que induce aumento en su ramificación, proceso que es regulado por miR-9 (Dajas-Bailador y cols., 2012). Mientras que MAP1B, se expresa con predominancia durante la neuritogénesis, MAP1A se expresa predominantemente en neuronas maduras (Noiges y cols., 2002). En este sentido, MAP1A ha sido descrito como mediador de la estabilidad en proteínas de las densidades post-sinápticas de manera dependiente de actividad (Szebenyi y cols., 2005). Análogamente, existe amplia evidencia sobre los efectos sinápticos y extra-sinápticos de MAP2 en dendritas. Por lo tanto, es posible que miR-26a regule los niveles de un repertorio de proteínas que convergen funcionalmente hacia una reducción de la extensión neurítica y tal vez, a una reducción de la sinaptogénesis, aspecto que no fue analizado en el presente trabajo. Así, los cambios de proteínas del citoesqueleto podrían promover, por ejemplo, la “poda sináptica” que forma parte de la regulación homeostática de los contactos sinápticos en donde participan astrocitos (Chung y cols., 2013), este proceso es fundamental para una adecuada función cognitiva y desarrollo emocional del ser humano (Tau y Peterson, 2010). Por otra parte, tal como se discutió, hay diversos miRNAs que pueden converger sobre la regulación de la morfología.

Otros blancos predichos y comprobados para miR-26a-5p con consecuencias en la morfología son BDNF, PTEN, y componentes de la vía Wnt, tales como Wnt5a y GSK3 $\beta$ , como se mostró en la introducción. Este efecto sobre la vía Wnt resulta muy interesante, puesto que aldolasa C activa directamente la

señalización de esta vía Wnt al interactuar con Axina (Caspi y cols., 2014). Es interesante especular que los miRNAs, además de regular genes funcionalmente relacionados (Hausser y Zavolan 2014), se asocian con proteínas (como aldolasa C) que, mediante un mecanismo adicional, regulan la misma ruta.

Considerando todo lo anterior, miR-26a es una molécula que se expresa preferencialmente en astrocitos y que una vez transferida a neuronas podría modificar, tanto la morfología neuronal como sus propiedades sinápticas, tendiendo a potenciar la actividad pre-sináptica (crecimiento axonal) por sobre la post-sináptica (desestabilización de densidades post-sinápticas y menor crecimiento neurítico).

#### **XI. Selectividad en el efecto de los exosomas de astrocitos y miR-26a-5p sobre neuronas corticales e hipocampales.**

Sorprendentemente, encontramos que las neuronas corticales, a diferencia de las hipocampales, son refractarias al efecto en la morfología inducido, tanto por los exosomas como por miR-26a-5p. Si bien no cuantificamos diferencias en la capacidad de incorporación de exosomas en ambos tipos neuronales, sí mostramos que los exosomas de astrocitos se internalizan en ambos. Sin embargo, no podemos descartar que una incorporación disminuída de estas vesículas en neuronas corticales pueda explicar el efecto diferencial.

Respecto de la respuesta diferencial de las neuronas corticales a miR-26a-5p, podemos descartar que se deba a una diferencia en la eficiencia de

transfección, puesto que el método usado es basado en una integración “mecánica” del oligonucleótido mediante magnetofección. Por otro lado, usando una sonda fluorescente, encontramos una eficiencia de transfección superior al 90%, similar a la de neuronas hipocampales. De manera que son mecanismos moleculares propios de cada tipo neuronal los que explicarían estas diferencias. Por ejemplo, se ha descrito que en cultivos de neuronas disociadas, la expresión de proteínas importantes para las sinaptogénesis, tales como GAP-43 y sinaptofisina, tiene temporalidades distintas en neuronas corticales e hipocampales (Kim y Lee, 2012). Mientras que en neuronas corticales los niveles de estas proteínas alcanzan un máximo a los 5 DIV, en neuronas hipocampales ese máximo se alcanza a los 10 DIV. Podemos especular que, si estos cambios son extensibles a otras proteínas relevantes para la sinaptogénesis, como MAP2, las neuronas corticales tendrían una mayor disponibilidad relativa de estos componentes que las harían menos sensibles a los efectos del mimic. En este sentido, nosotros encontramos que con la transfección del mimic los niveles de MAP2 A/B disminuyen solamente en neuronas hipocampales y no corticales, aunque este efecto se evaluó solamente 72 horas después de la transfección. Si bien miR-26a-5p debería inducir una disminución de MAP2 A/B en ambos tipos celulares, en neuronas corticales la tasa de síntesis de MAP2 A/B a los 3 DIV sería más alta, de manera que en estas células los niveles totales se recuperarían más rápido, impidiendo detectar diferencias a las 72 horas. Considerando lo anterior, estamos haciendo un curso temporal del efecto del mimic en los niveles

de MAP2 A/B a tiempos más breves e.g. 24 horas post-transfección, esperando ver efecto mayor en neuronas corticales a tiempos más breves.

Adicionalmente, el efecto diferencial de miR-26a-5p , podría explicarse por mayor presencia de otros transcritos y/o RNAs no codificantes que compiten con el mRNA de MAP2 A/B, actuando como competidores/inhibidores endógenos (Thomson y Dinger, 2016). En este sentido, ambos tipos neuronales, aunque muchas veces son considerados equivalentes en la literatura, expresan diferencialmente vías de señalización (Sandoval y cols., 2011), perfil lipídico (Ko y cols., 2005), responden diferencialmente a hipoxia (Ohmori y cols., 1996) o a la exposición a gluco-corticoides (Horner y cols.,1990).

Es muy interesante mencionar que las respuestas diferenciales descritas en cultivos de neuronas disociadas, reproducen las diferencias observadas en el tejido cortical o hipocampal de origen. Es así como, en general, el tejido hipocampal no sólo es más sensible que el cortical a los efectos deletéreos del estrés, si no que también a hipoxia, traumatismo cerebral, privación de glucosa o status epilepticus, entre otros fenómenos (Pérez-Rodríguez y cols., 2015; Rall y cols., 2003). En particular, se ha observado que los niveles de MAP2 A/B disminuyen selectivamente en hipocampo vs. corteza en un modelo de traumatismo cerebral (Taft y cols., 1992). Esta disminución selectiva de MAP2 A/B en hipocampo es también a nivel del transcrito, y no solamente para el mRNA de MAP2 A/B, sino que para una amplia gama de genes que se expresan diferencialmente en la corteza cerebral (Rall y cols., 2003). Adicionalmente, el

estrés crónico también es capaz de inducir una marcada disminución en los niveles de MAP2, tanto en hipocampo como en corteza, aunque esa disminución también parece ser más dramática en hipocampo (Yan y cols., 2010). El tejido cortical ha mostrado ser más resiliente que el hipocampal a la baja de los niveles de MAP2. Por ejemplo, en otro modelo de traumatismo cerebral, la disminución de los niveles de MAP2 en la corteza cerebral se recupera a los 90 minutos, mientras que en hipocampo, ocurre luego de 24 horas (Huh y cols., 2003). Esta recuperación más rápida en los niveles de MAP2 de la corteza cerebral podría explicar, en parte, la ausencia de efecto de miR-26a-5p que nosotros observamos en cultivos de neuronas disociadas desde corteza cerebral.

Una consideración adicional para explicar el efecto diferencial de los exosomas sobre neuronas hipocampales y corticales es un efecto homotípico vs. heterotípico que ha sido previamente documentado. Así, Chamak y cols., muestran que la comunicación astrocito-neurona puede determinar el grado de ramificación de una neurona, dependiendo de si los astrocitos son de la misma zona cerebral (co-cultivo homotípico) o de zonas distintas (co-cultivo heterotípico) (Chamak y cols., 1987). En general, se ha visto que las ramificaciones de dendritas, mantienen o aumentan en longitud y complejidad en co-cultivos homotípicos, mientras que el axón se mantiene o disminuye en longitud. Por otro lado, en cultivos heterotípicos puede observarse que el árbol dendrítico tiende a disminuir en tamaño mientras que el axón se mantiene o alarga (Rousselet y cols., 1990; Le Roux y Reh, 1994; Chamak y cols., 1987). Rousselet, por ejemplo,



encuentra que existen tanto factores solubles como "insolubles" (tal vez membranosos), que podrían explicar el efecto diferencial del medio de astrocitos de una región cerebral, sobre neuronas de otra región. Considerando lo expuesto anteriormente, una explicación interesante es considerar que los astrocitos que cultivamos son mayoritariamente corticales, y por lo tanto, sus exosomas inducen retracción en neuritas/dendritas de neuronas hipocampales (efecto heterotípico), pero no en neuronas corticales (cultivos homotípicos). Sería interesante averiguar qué efecto tienen exosomas de astrocitos hipocampales sobre neuronas corticales.

## **XII. Potencial participación de aldolasa C y miR-26a en patologías neurológicas relacionadas al estrés.**

### **1. Regulación del contenido de aldolasa C en enfermedades relacionadas al estrés:**

Se considera que la expresión de aldolasa C ocurre predominantemente en astrocitos telencefálicos y en neuronas de cerebelo, lo que le confiere valor como potencial biomarcador periférico de estados patológicos que afecten a estas estructuras. Al respecto, esta enzima alcanza concentraciones de 6520 ng/mg de proteína en el SNC. Fuera del SNC, la mayor concentración está en el corazón (529 ng/mg de proteína). Además, está presente en otros tejidos, tales como en el hígado (149 ng/ mg de proteína) y testículos (180 ng/mg de proteína) (Haimoto y Kato, 1986). Es muy interesante que esta enzima se puede detectar tanto en el suero (Day y Thompson, 1984) como en LCR de personas sanas y

que su aumento en LCR se asocia con trastornos neurológicos, confiriéndole valor como un potencial bio-marcador periférico de alteraciones en el SNC (Willson y cols., 1980). En relación a las enfermedades neuro-siquiátricas asociadas al estrés, se ha reportado que existe un cambio en el patrón de fosforilación de aldolasa C en LCR de pacientes con Depresión Mayor (Ditzen y cols., 2012). En este sentido, los niveles de aldolasa C aumentan en el lóbulo frontal (corteza) de pacientes diagnosticados con depresión mayor, trastorno bipolar y esquizofrenia (Johnston-Wilson y cols., 2000). Este resultado es tremendamente relevante, puesto que asumiendo que en la corteza cerebral aldolasa C se expresa exclusivamente en astrocitos, este aumento podría relacionarse con el cambio en la composición de los exosomas y los efectos sobre neuronas hipocampales que describimos en esta tesis, poniendo de manifiesto su potencial relevancia en los mecanismos adaptativos inducidos en el cerebro de pacientes con Depresión Mayor.

En relación a los modelos animales de trastornos del ánimo, en el laboratorio de Neurociencias de La Universidad de Los Andes se encontró un aumento diferencial de aldolasa C en LCR de ratas sometidas a dos protocolos de estrés que inducen síntomas depresivos: inmovilización y restricción de movimiento (Ampuero y cols., 2015). En este trabajo se encontró que las ratas sometidas a restricción de movimiento tienen un mayor contenido de aldolasa C en exosomas obtenidos desde LCR. Además, los síntomas tipo depresivos presentes en estos animales se restauran selectivamente luego del tratamiento con el antidepresivo fluoxetina (inhibidor de la recaptación de serotonina) y no

con reboxetina (inhibidor selectivo de la recaptación de noradrenalina). Previamente, habíamos demostrado que el tratamiento de ratas no estresadas con fluoxetina aumenta más de 7 veces el contenido de aldolasa C en una fracción microsomal e induce un aumento significativo en el contenido de la enzima en LCR (Sandoval y cols., 2013). La aparente discordancia entre el aumento de aldolasa C, inducido tanto por un antidepresivo como por un modelo de estrés, se podría explicar porque ésta sería una respuesta adaptativa frente al estrés, tendiente a neutralizar sus efectos de forma similar a un antidepresivo. Como ya se mencionó, en esta tesis encontramos que el contenido de aldolasa C en exosomas aumenta luego de un protocolo específico de estrés por restricción de movimiento y, antecedentes del laboratorio de Neurociencias de La Universidad de Los Andes, muestran que este aumento se reproduce en exosomas obtenidos desde el suero. En este sentido, se ha planteado que estos exosomas, fundamentalmente provenientes de astrocitos del SNC, puedan llegar al torrente sanguíneo y constituir un mecanismo asequible para predecir sintomatología tipo depresiva, entre otras posibles interacciones con la periferia del organismo. La posibilidad de comunicación de una amplia zona del cerebro con órganos periféricos tendría consecuencias muy relevantes en la comorbilidad observada en los trastornos del ánimo con otras patologías. En este sentido, existe evidencia del tránsito de exosomas desde el SNC hacia la sangre, y desde la sangre al SNC (Alvarez-Erviti y cols., 2011; Cooper y cols., 2014). El estudio del efecto de los exosomas portadores de aldolasa C en distintos tipos celulares, podría constituir la puerta de entrada para entender el rol de los

exosomas derivados de astrocitos en la fisiología del organismo a un nivel sistémico.

## **2. Regulación del contenido de miR-26a en patologías relacionadas con el estrés:**

Ha sido reportado en numerosos estudios que miR-26a se encuentra alterado en patologías neurodegenerativas y neuropsiquiátricas. Por ejemplo, miR-26a aumenta en el suero de personas sometidas a estrés académico (Maffioletti y cols., 2014; Honda y cols., 2013) y de pacientes con depresión mayor tratados con el fármaco antidepresivo serotoninérgico escitalopram, el cual tiene un mecanismo de acción similar al de fluoxetina (Bocchio-Chiavetto y cols., 2013). En relación a la depresión mayor, el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), el cual ha mostrado ser fundamental para entender los cambios plásticos inducidos en el cerebro por los antidepresivos y el estrés (Castrén, 2005; Wyneken y cols., 2006), también es regulado por este miR-26a (Caputo y cols., 2011). Si bien no podemos establecer hasta qué punto el contenido de miR-26a en exosomas derivados de astrocitos es correspondido por la presencia de aldolasa C, proponemos que ambos componentes serían mediadores relevantes en la adaptación al estrés, pudiendo actuar individualmente o de manera convergente.

### **XIII. Relevancia de los cambios dendríticos inducidos por exosomas de astrocitos en neuronas hipocampales y su relación con la adaptación al estrés.**

Las funciones más distintivas del sistema nervioso, recaen sobre la particular estructura morfológica y molecular de las neuronas. Estas células se conectan formando redes exquisitamente organizadas que determinan funciones que van desde el procesamiento sensorial/motor hasta la generación de habilidades cognitivas y la autoconciencia (Varela y cols., 2001). Las neuronas son células excitables altamente polarizadas que permiten el flujo unidireccional del impulso nervioso. Estas señales eléctricas son integradas en el árbol dendrítico, donde se alojan los receptores de neurotransmisores tanto ionotrópicos como metabotrópicos, que tras unir su ligando, modifican el potencial de membrana. El cambio de potencial de membrana inducido en cada uno de los terminales sinápticos (en promedio 10.000 por neurona) será integrado de modo tal que la despolarización en el cono axónico sea suficiente como para gatillar un potencial de acción. Si se genera un potencial de acción, éste viajará a lo largo del axón, para posteriormente inducir la apertura de canales de calcio sensibles a voltaje en el terminal sináptico. La entrada de calcio favorecerá la fusión de vesículas, liberando neurotransmisores que modificarán el potencial de membrana de la neurona post-sináptica.

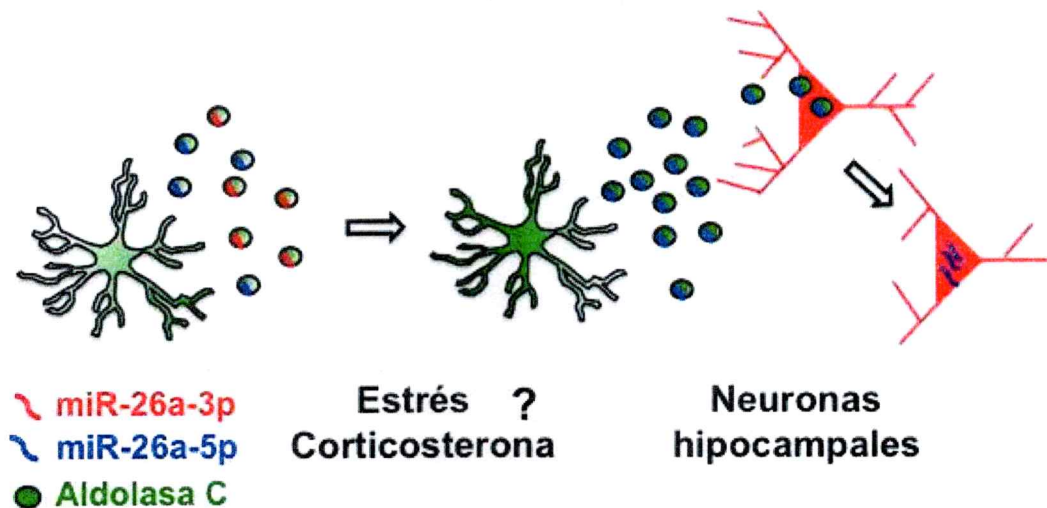
El adecuado crecimiento y ramificación de las dendritas determina el grado de inervación que recibirá una neurona (McAllister, 2000). Esto tiene

consecuencias relevantes en el procesamiento cognitivo y emocional de los mamíferos. De hecho, se piensa que los trastornos emocionales vinculados al estrés, dependen de una conectividad estructural y funcional aberrante que genera conductas depresivas a repetición (Castrén, 2013). Es así como un tratamiento antidepresivo eficaz, sería capaz de abrir una ventana de plasticidad que favorece una reconfiguración de la conectividad cerebral aberrante (Castrén, 2005). Sin duda que la reorganización de la conectividad/función neuronal inducida por el estrés, implica cambios en la citoarquitectura, que de forma similar a nuestros resultados, en general son más pronunciados en el hipocampo que en la corteza cerebral (McEwen y cols., 2016). Es interesante que MAP2 ha mostrado ser una proteína especialmente sensible a diferentes estímulos del sistema nervioso, y como hemos discutido, cambios en sus niveles están íntimamente relacionados con la morfología dendrítica (McAllister, 2000). Es más, la disminución de la estabilidad de los microtúbulos, favorecida por la baja de MAP2, podría posibilitar la formación de nuevas ramificaciones que redundarán en la reorganización de una determinada red neural. La alteración sobre la función hipocampal puede tener consecuencias conductuales importantes en todo el telencéfalo, puesto que el hipocampo es la puerta de entrada a diferentes componentes de la memoria espacial, declarativa y adquisición de nuevos recuerdos (Becker, 2005).

Los resultados de esta tesis muestran un aumento de aldolasa C en exosomas del SNC como respuesta a un protocolo de estrés *in vivo* y que los

exosomas de astrocitos que sobre-expresan aldolasa C disminuyen selectivamente la ramificación dendrítica hipocampal *in vitro*. Ambos elementos nos permiten proponer que los exosomas portadores de aldolasa C formarían parte un mecanismo relevante para la adaptación al estrés.

Finalmente, considerando los principales resultados de esta tesis, en la figura 28, se propone un modelo de interacción astrocito-neurona mediado por exosomas.



**Figura 28. Modelo propuesto según los resultados de esta tesis.** Aldolasa C es una enzima glicolítica que se expresa preferentemente en astrocitos al igual que el ácido nucleico miR-26a. El aumento de aldolasa C en astrocitos se asocia a un aumento en el contenido de miR-26 a-5p total y en exosomas, a la vez que a una disminución de miR-26a-3p en estas vesículas. Estos exosomas son capaces de internalizarse en neuronas e inducir una disminución en la ramificación dendrítica selectivamente en neuronas hipocámpicas dependiente de miR-26a-5p. El aumento en el contenido de aldolasa C observado en

exosomas obtenidos desde LCR de animales estresados, sugiere que los efectos descritos *in vitro* sobre neuronas hipocampales podrían reproducirse *in vivo*, mediando cambios adaptativos al estrés.



## CONCLUSIÓN

Este trabajo muestra por primera vez que una enzima enriquecida en astrocitos telencefálicos, y clásicamente asociada a funciones metabólicas, está presente en exosomas y puede transferirse, tanto a neuronas corticales como hipocampales, mediante ellos. La presencia de aldolasa C en astrocitos se asocia con un aumento en el contenido de miR-26a-5p en exosomas, el cual es responsable de la disminución en la arborización dendrítica inducida selectivamente en neuronas hipocampales tratadas con estas vesículas. El aumento de aldolasa C en exosomas obtenidos desde LCR *in vivo*, inducido por un protocolo de restricción de movimiento, sugiere que los exosomas portadores de aldolasa C podrían mediar cambios adaptativos asociados a patologías neuropsiquiátricas relacionadas con el estrés.

## REFERENCIAS

- Absalon, S., Kochanek, D.M., Raghavan, V., y Krichevsky, A.M. 2013. MiR-26b, upregulated in Alzheimer's disease, activates cell cycle entry, tau-phosphorylation, and apoptosis in postmitotic neurons. *J. Neurosci.* 33: 14645–59.
- Adler, J., Pagakis, S.N., y Parmryd, I. 2008. Replicate-based noise corrected correlation for accurate measurements of colocalization. *J. Microsc.* 230: 121–133.
- Agnati, L.F., Guidolin, D., Guescini, M., Genedani, S., y Fuxe, K. 2010. Understanding wiring and volume transmission. *Brain Res. Rev.* 64: 137–159.
- Agulhon, C., Petravicz, J., McMullen, A.B., Sweger, E.J., Minton, S.K., Taves, S.R., Casper, K.B., Fiacco, T.A., y McCarthy, K.D. 2008. What Is the Role of Astrocyte Calcium in Neurophysiology?. *Neuron* 59: 932–946.
- Aldred, S.F., Collins, P., y Trinklein, N. 2011. Identifying Targets of Human microRNAs with the LightSwitch Luciferase Assay System using 3'UTR-reporter Constructs and a microRNA Mimic in Adherent Cells. *J. Vis. Exp.*: 1–5.
- Alexander, M., Hu, R., Runtsch, M.C., Kagele, D. a, Mosbrugger, T.L., Tolmachova, T., Seabra, M.C., Round, J.L., Ward, D.M., y O'Connell, R.M. 2015. Exosome-delivered microRNAs modulate the inflammatory response to endotoxin. *Nat. Commun.* 6: 7321.
- Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Yin, H., Betts, C., Lakhai, S., y Wood, M.J. 2011. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat. Biotechnol.* 29: 341–5.
- Ampuero, E., Luarte, A., Santibañez, M., Varas-Godoy, M., Toledo, J., Diaz-Veliz, G., Cavada, G., Rubio, F.J., y Wyneken, U. 2015. Two Chronic Stress Models Based on Movement Restriction in Rats Respond Selectively to Antidepressant Drugs: Aldolase C As a Potential Biomarker. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 18: pyv038.
- Ampuero, E., Stehberg, J., Gonzalez, D., Besser, N., Ferrero, M., Diaz-Veliz, G., Wyneken, U., y Rubio, F.J. 2013. Repetitive fluoxetine treatment affects long-term memories but not learning. *Behav. Brain Res.* 247: 92–100.
- Baietti, M.F., Zhang, Z., Mortier, E., Melchior, A., Degeest, G., Geeraerts, A., Ivarsson, Y., Depoortere, F., Coomans, C., Vermeiren, E., Zimmermann, P., y David, G. 2012. Syndecan–syntenin–ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat. Cell Biol.* 14: 677–685.

- Baron, C.B., Greeley, P., y Coburn, R.F. 1998. Smooth muscle aldolase C-bound inositol 1,4,5-trisphosphate studied in vitro under physiological conditions. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1401: 81–92.
- Baron, C.B., Ozaki, S., Watanabe, Y., Hirata, M., LaBelle, E.F., y Coburn, R.F. 1995. Inositol 1,4,5-trisphosphate binding to porcine tracheal smooth muscle aldolase. *J. Biol. Chem.* 270: 20459–20465.
- Barros, L.F. 2013. Metabolic signaling by lactate in the brain. *Trends Neurosci.* 36: 396–404.
- Basso, M. y Bonetto, V. 2016. Extracellular vesicles and a novel form of communication in the brain. *Front. Neurosci.* 10.
- Bátiz, L.F., Castro, M.A., Burgos, P. V., Velásquez, Z.D., Muñoz, R.I., Lafourcade, C.A., Troncoso-Escudero, P., y Wyneken, U. 2016. Exosomes as Novel Regulators of Adult Neurogenic Niches. *Front. Cell. Neurosci.* 9: 1–28.
- Beazely, M.A., Weerapura, M., y Macdonald, J.F. 2008. Abelson tyrosine kinase links PDGFbeta receptor activation to cytoskeletal regulation of NMDA receptors in CA1 hippocampal neurons. *Mol. Brain* 1: 20.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry*. 5th edition. New York: W H Freeman. 2002. Glycolysis Is an Energy-Conversion Pathway in Many Organisms. Section 16.1. 5th ed. W H Freeman, New York.
- Berwick, D.C. y Harvey, K. 2012. The importance of Wnt signalling for neurodegeneration in Parkinson's disease. *Biochem. Soc. Trans.* 40: 1123–8.
- Bhat, S., Dao, D.T., Terrillion, C.E., Arad, M., Smith, R.J., Soldatov, N.M., y Gould, T.D. 2012. CACNA1C (Cav1.2) in the pathophysiology of psychiatric disease. *Prog. Neurobiol.* 99: 1–14.
- Bocchio-Chiavetto, L., Maffioletti, E., Bettinsoli, P., Giovannini, C., Bignotti, S., Tardito, D., Corrada, D., Milanese, L., y Gennarelli, M. 2013. Blood microRNA changes in depressed patients during antidepressant treatment. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 23: 602–611.
- Brunson, K.L., Khan, N., Eghbal-Ahmadi, M., y Baram, T.Z. 2001. Corticotropin (ACTH) acts directly on amygdala neurons to down-regulate corticotropin-releasing hormone gene expression. *Ann. Neurol.* 49: 304–312.
- Caceres, A., Mautino, J., y Kosik, K.S. 1992. Suppression of MAP2 in cultured cerebellar macroneurons inhibits minor neurite formation. *Neuron* 9: 607–618.
- Cahoy, J.D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L.C., Zamanian, J.L., Christopherson, K.S., Xing, Y., Lubischer, J.L., Krieg, P.A., Krupenko, S.A., Thompson, W.J., y Barres, B.A. 2008. A transcriptome database for astrocytes, neurons, and

oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J. Neurosci.* 28: 264–278.

Cañete-Soler, R., Reddy, K.S., Tolan, D.R., y Zhai, J. 2005. Aldolases A and C are ribonucleolytic components of a neuronal complex that regulates the stability of the light-neurofilament mRNA. *J. Neurosci.* 25: 4353–4364.

Caputo, V., Sinibaldi, L., Fiorentino, A., Parisi, C., Catalanotto, C., Pasini, A., Cogoni, C., y Pizzuti, A. 2011a. Brain derived neurotrophic factor (BDNF) expression is regulated by microRNAs miR-26a and miR-26b allele-specific binding. *PLoS One* 6: e28656.

Caputo, V., Sinibaldi, L., Fiorentino, A., Parisi, C., Catalanotto, C., Pasini, A., Cogoni, C., y Pizzuti, A. 2011b. Brain derived neurotrophic factor (BDNF) expression is regulated by microRNAs miR-26a and miR-26b allele-specific binding. *PLoS One* 6: e28656.

Caspi, M., Perry, G., Skalka, N., Meisel, S., Firsow, A., Amit, M., y Rosin-Arbesfeld, R. 2014. Aldolase positively regulates of the canonical Wnt signaling pathway. *Mol. Cancer* 13: 164.

Cassimeris, L. y Spittle, C. 2001. Regulation of microtubule-associated proteins. *Int. Rev. Cytol.* 210: 163–226.

Castello, A., Hentze, M.W., y Preiss, T. 2015. Metabolic Enzymes Enjoying New Partnerships as RNA-Binding Proteins. *Trends Endocrinol. Metab.* 26: 746–757.

Chairoungdua, A., Smith, D.L., Pochard, P., Hull, M., y Caplan, M.J. 2010. Exosome release of beta-catenin: A novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. *J. Cell Biol.* 190: 1079–1091.

Chamak, B., Fellous, a, Glowinski, J., y Prochiantz, A. 1987. MAP2 expression and neuritic outgrowth and branching are coregulated through region-specific neuro-astroglial interactions. *J. Neurosci.* 7: 3163–3170.

Chaput, N. y Théry, C. 2010. Exosomes: immune properties and potential clinical implementations. *Semin. Immunopathol.*: 1–22.

Chatterjee, S. y Sikdar, S.K. 2013. Corticosterone treatment results in enhanced release of peptidergic vesicles in astrocytes via cytoskeletal rearrangements. *Glia* 61: 2050–2062.

Chen, F. y LoTurco, J. 2012. A method for stable transgenesis of radial glia lineage in rat neocortex by piggyBac mediated transposition. *J. Neurosci. Methods* 207: 172–180.

- Chivet, M., Javalet, C., Laulagnier, K., Blot, B., Hemming, F.J., y Sadoul, R. 2014. Exosomes secreted by cortical neurons upon glutamatergic synapse activation specifically interact with neurons. *J. Extracell. vesicles* 3: 24722.
- Chung, W.-S., Clarke, L.E., Wang, G.X., Stafford, B.K., Sher, A., Chakraborty, C., Joung, J., Foo, L.C., Thompson, A., Chen, C., Smith, S.J., y Barres, B.A. 2013. Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature* 504: 394–400.
- Ciani, L. y Salinas, P.C. 2005. WNTs in the vertebrate nervous system: from patterning to neuronal connectivity. *Nat. Rev. Neurosci.* 6: 351–362.
- Cocucci, E. y Meldolesi, J. 2015. Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends Cell Biol.* 25: 364–372.
- Collino, F., Bruno, S., Incarnato, D., Dettori, D., Neri, F., Provero, P., Pomatto, M., Oliviero, S., Tetta, C., Quesenberry, P.J., y Camussi, G. 2015. AKI Recovery Induced by Mesenchymal Stromal Cell- Derived Extracellular Vesicles Carrying MicroRNAs. *J Am Soc Nephrol* 26: 2349–2360.
- Colombo, M., Raposo, G., y Théry, C. 2014. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* 30: 255–89.
- Cooper, J.M., Wiklander, P.B.O., Nordin, J.Z., Al-Shawi, R., Wood, M.J., Vithlani, M., Schapira, A.H. V, Simons, J.P., El-Andaloussi, S., y Alvarez-Erviti, L. 2014. Systemic exosomal siRNA delivery reduced alpha-synuclein aggregates in brains of transgenic mice. *Mov. Disord.* 29: 1476–85.
- Costes, S. V, Daelemans, D., Cho, E.H., Dobbin, Z., Pavlakis, G., y Lockett, S. 2004. Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. *Biophys. J.* 86: 3993–4003.
- Court, F. a, Hendriks, W.T.J., MacGillavry, H.D., Alvarez, J., y van Minnen, J. 2008. Schwann cell to axon transfer of ribosomes: toward a novel understanding of the role of glia in the nervous system. *J. Neurosci.* 28: 11024–11029.
- Dajas-Bailador, F., Bonev, B., Garcez, P., Stanley, P., Guillemot, F., y Papalopulu, N. 2012. microRNA-9 regulates axon extension and branching by targeting Map1b in mouse cortical neurons. *Nat. Neurosci.* 15: 697–699.
- Daniels, M. y Brown, D.R. 2001. Astrocytes Regulate N-Methyl-D-aspartate Receptor Subunit Composition Increasing Neuronal Sensitivity to Excitotoxicity. *J. Biol. Chem.* 276: 22446–22452.
- Day, I.N. y Thompson, R.J. 1984. Levels of immunoreactive aldolase C, creatine kinase-BB, neuronal and non-neuronal enolase, and 14-3-3 protein in circulating human blood cells. *Clin. Chim. Acta.* 136: 219–28.

Derksen, M.J., Ward, N.L., Hartle, K.D., y Ivanco, T.L. 2007. MAP2 and synaptophysin protein expression following motor learning suggests dynamic regulation and distinct alterations coinciding with synaptogenesis. *Neurobiol. Learn. Mem.* 87: 404–415.

Ditzen, C., Tang, N., Jastorff, A.M., Teplytska, L., Yassouridis, A., Maccarrone, G., Uhr, M., Bronisch, T., Miller, C. a, Holsboer, F., y Turck, C.W. 2012. Cerebrospinal Fluid Biomarkers for Major Depression Confirm Relevance of Associated Pathophysiology. *Neuropsychopharmacology* 37: 1013–1025.

Dotti, C.G., Sullivan, C. a, y Banker, G. A. 1988. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* 8: 1454–1468.

Dubey, J., Ratnakaran, N., y Koushika, S.P. 2015. Neurodegeneration and microtubule dynamics: death by a thousand cuts. *Front. Cell. Neurosci.* 9: 343.

Ekström, E.J., Bergenfelz, C., von Bülow, V., Serifler, F., Carlemalm, E., Jönsson, G., Andersson, T., y Leandersson, K. 2014. WNT5A induces release of exosomes containing pro-angiogenic and immunosuppressive factors from malignant melanoma cells. *Mol. Cancer* 13: 1–15.

Emmanouilidou, E., Melachroinou, K., Roumeliotis, T., Garbis, S.D., Ntzouni, M., Margaritis, L.H., Stefanis, L., y Vekrellis, K. 2010. Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. *J. Neurosci.* 30: 6838–6851.

Escola, J.M., Kleijmeer, M.J., Stoorvogel, W., Griffith, J.M., Yoshie, O., y Geuze, H.J. 1998. Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 273: 20121–20127.

Feng, D., Zhao, W.L., Ye, Y.Y., Bai, X.C., Liu, R.Q., Chang, L.F., Zhou, Q., y Sui, S.F. 2010. Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic* 11: 675–687.

Ferreira, T.A., Blackman, A. V, Oyrer, J., Jayabal, S., Chung, A.J., Watt, A.J., Sjöström, P.J., y van Meyel, D.J. 2014. Neuronal morphometry directly from bitmap images. *Nat. Methods* 11: 982–984.

Fitzner, D., Schnaars, M., van Rossum, D., Krishnamoorthy, G., Dibaj, P., Bakhti, M., Regen, T., Hanisch, U.-K., y Simons, M. 2011. Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. *J. Cell Sci.* 124: 447–458.

Freitas-Andrade, M. y Naus, C.C. 2016. Astrocytes in neuroprotection and neurodegeneration: The role of connexin43 and pannexin1. *Neuroscience* 323: 207–221.

Frühbeis, C. y cols., 2013. Neurotransmitter-Triggered Transfer of Exosomes Mediates Oligodendrocyte-Neuron Communication. *PLoS Biol.* 11.

Fruttiger, M., Calver, A.R., Krüger, W.H., Mudhar, H.S., Michalovich, D., Takakura, N., Nishikawa, S.I., y Richardson, W.D. 1996. PDGF mediates a neuron-astrocyte interaction in the developing retina. *Neuron* 17: 1117–1131.

Gibbins, D.J., Ciaudo, C., Erhardt, M., y Voinnet, O. 2009. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *TL - 11. Nat. Cell Biol.* 11 VN - r: 1143–1149.

Gomes, C., Keller, S., Altevogt, P., y Costa, J. 2007. Evidence for secretion of Cu,Zn superoxide dismutase via exosomes from a cell model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci. Lett.* 428: 43–46.

Guček, A., Vardjan, N., y Zorec, R. 2012. Exocytosis in astrocytes: transmitter release and membrane signal regulation. *Neurochem. Res.* 37: 2351–2363.

Guitart, K., Loers, G., Buck, F., Bork, U., Schachner, M., y Kleene, R. 2016. Improvement of neuronal cell survival by astrocyte-derived exosomes under hypoxic and ischemic conditions depends on prion protein. *Glia* 64: 896–910.

Ha, M. y Kim, V.N. 2014. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15: 509–524.

Haidet-Phillips, A.M. y cols., 2011. Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. *Nat. Biotechnol.* 29: 824–828.

Hansen, K. y Obrietan, K. 2013. MicroRNA as therapeutic targets for treatment of depression. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 9: 1011–1021.

Hanson, P.I. y Cashikar, A. 2012. Multivesicular Body Morphogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 28: 337–362.

Harding, C., Heuser, J., y Stahl, P. 1983. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J. Cell Biol.* 97: 329–339.

Hausser, J. y Zavolan, M. 2014. Identification and consequences of miRNA-target interactions - beyond repression of gene expression. *Nat. Rev. Genet.* 15: 599–612.

Hitoshi, N., Ken-ichi, Y., y Jun-ichi, M. 1991. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108: 193–199.

- Hoffman, E. a, Perkumas, K.M., Highstrom, L.M., y Stamer, W.D. 2009. Regulation of myocilin-associated exosome release from human trabecular meshwork cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50: 1313–1318.
- Honda, M., Kuwano, Y., Katsuura-Kamano, S., Kamezaki, Y., Fujita, K., Akaike, Y., Kano, S., Nishida, K., Masuda, K., y Rokutan, K. 2013. Chronic academic stress increases a group of microRNAs in peripheral blood. *PLoS One* 8: e75960.
- Horner, H.C., Packan, D.R., y Sapolsky, R.M. 1990. Glucocorticoids inhibit glucose transport in cultured hippocampal neurons and glia. *Neuroendocrinology* 52: 57–64.
- Hu, G., Yao, H., Chaudhuri, A.D., Duan, M., Yelamanchili, S. V, Wen, H., Cheney, P.D., Fox, H.S., y Buch, S. 2012. Exosome-mediated shuttling of microRNA-29 regulates HIV Tat and morphine-mediated Neuronal dysfunction. *Cell Death Dis.* 3: e381.
- Huang, C.-J., Nguyen, P.N.N., Choo, K.B., Sugii, S., Wee, K., Cheong, S.K., y Kamarul, T. 2014. Frequent co-expression of miRNA-5p and -3p species cross-targeting in induced pluripotent stem cells. *Int. J. Med. Sci.* 11: 824–33.
- Hurley, J.H. y Odorizzi, G. 2012. Get on the exosome bus with ALIX. *Nat. Cell Biol.* 14: 654–5.
- Huse, J.T., Brennan, C., Hambardzumyan, D., Wee, B., Pena, J., Rouhanifard, S.H., Sohn-Lee, C., Le Sage, C., Agami, R., Tuschl, T., y Holland, E.C. 2009. The PTEN-regulating microRNA miR-26a is amplified in high-grade glioma and facilitates gliomagenesis in vivo. *Genes Dev.* 23: 1327–1337.
- Inestrosa, N.C., Montecinos-Oliva, C., y Fuenzalida, M. 2012. Wnt signaling: role in Alzheimer disease and schizophrenia. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 7: 788–807.
- Inestrosa, N.C. y Varela-Nallar, L. 2014. Wnt signaling in the nervous system and in Alzheimer's disease. *J. Mol. Cell Biol.* 6: 64–74.
- Jeffery, C.J. 2003. Moonlighting proteins: Old proteins learning new tricks. *Trends Genet.* 19: 415–417.
- Jiang, J.J., Liu, C.M., Zhang, B.Y., Wang, X.W., Zhang, M., Zhang, S.R., Hall, P., Hu, Y.W., y Zhou, F.Q. 2015. MicroRNA-26a supports mammalian axon regeneration in vivo by suppressing GSK3 $\beta$  expression. *Cell Death Dis.* 6: e1865.
- Johnston-Wilson, N.L., Sims, C.D., Hofmann, J.P., Anderson, L., Shore, a D., Torrey, E.F., y Yolken, R.H. 2000. Disease-specific alterations in frontal cortex brain proteins in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. The Stanley Neuropathology Consortium. *Mol. Psychiatry* 5: 142–149.



Jovičić, A., Roshan, R., Moiso, N., Pradervand, S., Moser, R., Pillai, B., y Luthi-Carter, R. 2013. Comprehensive expression analyses of neural cell-type-specific miRNAs identify new determinants of the specification and maintenance of neuronal phenotypes. *Ann. Intern. Med.* 158: 5127–5137.

Kao, A.W., Noda, Y., Johnson, J.H., Pessin, J.E., y Saltiel, A.R. 1999. Aldolase mediates the association of F-actin with the insulin-responsive glucose transporter GLUT4. *J. Biol. Chem.* 274: 17742–17747.

Katsuda, T. y Ochiya, T. 2015. Molecular signatures of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicle-mediated tissue repair. *Stem Cell Res. Ther.* 6: 212.

Keasey, M.P., Kang, S.S., Lovins, C., y Hagg, T. 2013. Inhibition of a novel specific neuroglial integrin signaling pathway increases STAT3-mediated CNTF expression. *Cell Commun. Signal.* 11: 35.

Kessler, R.C. 1997. The effects of stressful life events on depression. *Annu. Rev. Psychol.* 48: 191–214.

Knight, S.W. y Bass, B.L. 2001. A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 293: 2269–71.

Ko, M., Zou, K., Minagawa, H., Yu, W., Gong, J.S., Yanagisawa, K., y Michikawa, M. 2005. Cholesterol-mediated neurite outgrowth is differently regulated between cortical and hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* 280: 42759–42765.

Koles, K., Nunnari, J., Korkut, C., Barria, R., Brewer, C., Li, Y., Leszyk, J., Zhang, B., y Budnik, V. 2012. Mechanism of evenness interrupted (Evi)-exosome release at synaptic boutons. *J. Biol. Chem.* 287: 16820–16834.

De Koninck, P., Carbonetto, S., y Cooper, E. 1993. NGF induces neonatal rat sensory neurons to extend dendrites in culture after removal of satellite cells. *J. Neurosci.* 13: 577–585.

Koppers-Lalic, D. y cols., 2014. Nontemplated nucleotide additions distinguish the small RNA composition in cells from exosomes. *Cell Rep.* 8: 1649–1658.

Kosaka, N., Iguchi, H., Hagiwara, K., Yoshioka, Y., Takeshita, F., y Ochiya, T. 2013. Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic micrnas regulate cancer cell metastasis. *J. Biol. Chem.* 288: 10849–10859.

Kosik, K.S. y Finch, E. 1987. MAP2 and tau segregate into dendritic and axonal domains after the elaboration of morphologically distinct neurites: an immunocytochemical study of cultured rat cerebrum. *J. Neurosci.* 7: 3142–3153.

Kowal, J., Arras, G., Colombo, M., Jouve, M., Morath, J.P., Primdal-Bengtson, B., Dingli, F., Loew, D., Tkach, M., y Théry, C. 2016. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113: E968–E977.

Kowal, J., Tkach, M., y Théry, C. 2014. Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 29: 116–125.

Krishnan, K. y cols., 2013. MicroRNA-182-5p targets a network of genes involved in DNA repair. *RNA* 19: 230–42.

Kuga, N., Sasaki, T., Takahara, Y., Matsuki, N., y Ikegaya, Y. 2011. Large-scale calcium waves traveling through astrocytic networks in vivo. *J. Neurosci.* 31: 2607–14.

Kusakabe, T., Motoki, K., y Hori, K. 1994. Human aldolase C: characterization of the recombinant enzyme expressed in *Escherichia coli*. *J. Biochem.* 115: 1172–1177.

Kye, M.-J., Liu, T., Levy, S.F., Xu, N.L., Groves, B.B., Bonneau, R., Lao, K., y Kosik, K.S. 2007. Somatodendritic microRNAs identified by laser capture and multiplex RT-PCR. *RNA* 13: 1224–1234.

Lachenal, G., Pernet-Gallay, K., Chivet, M., Hemming, F.J., Belly, A., Bodon, G., Blot, B., Haase, G., Goldberg, Y., y Sadoul, R. 2011. Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity. *Mol. Cell. Neurosci.* 46: 409–418.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.

Lafon-Cazal, M., Adjali, O., Galéotti, N., Poncet, J., Jouin, P., Homburger, V., Bockaert, J., y Marin, P. 2003. Proteomic analysis of astrocytic secretion in the mouse: Comparison with the cerebrospinal fluid proteome. *J. Biol. Chem.* 278: 24438–24448.

Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., y Kim, V.N. 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425: 415–419.

Leidinger, P. y cols., 2013. A blood based 12-miRNA signature of Alzheimer disease patients. *Genome Biol.* 14: R78.

Lew, C.R. y Tolan, D.R. 2012. Targeting of several glycolytic enzymes using RNA interference reveals aldolase affects cancer cell proliferation through a non-glycolytic mechanism. *J. Biol. Chem.* 287: 42554–42563.

- Li, B. y Sun, H. 2013. MiR-26a promotes neurite outgrowth by repressing PTEN expression. *Mol. Med. Rep.* 8: 676–680.
- Lima, a, Sardinha, V.M., Oliveira, a F., Reis, M., Mota, C., Silva, M. a, Marques, F., Cerqueira, J.J., Pinto, L., Sousa, N., y Oliveira, J.F. 2014. Astrocyte pathology in the prefrontal cortex impairs the cognitive function of rats. *Mol. Psychiatry* 19: 834–41.
- Ling, H., Fabbri, M., y Calin, G. 2013. MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12: 847–65.
- Liu, Y., Lv, K., Li, Z., Yu, A.C.H., Chen, J., y Teng, J. 2012. PACSIN1, a Tau-interacting protein, regulates axonal elongation and branching by facilitating microtubule instability. *J. Biol. Chem.* 287: 39911–39924.
- Livak, K.J. y Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* 25: 402–408.
- Loffreda, A., Rigamonti, A., Barabino, S.M.L., y Lenzken, S.C. 2015. RNA-Binding Proteins in the Regulation of miRNA Activity: A Focus on Neuronal Functions. *Biomolecules* 5: 2363–2387.
- Lopez-Verrilli, M.A. y Court, F.A. 2012. Transfer of vesicles from Schwann cell to axon: a novel mechanism of communication in the peripheral nervous system. *Front. Physio.* 3:205.
- Lötvall, J. y cols., 2014. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J. Extracell. vesicles* 3: 26913.
- Maffioletti, E., Tardito, D., Gennarelli, M., y Bocchio-Chiavetto, L. 2014. Microspies from the brain to the periphery: new clues from studies on microRNAs in neuropsychiatric disorders. *Front. Cell. Neurosci.* 8: 75.
- Mageswaran, S.K., Dixon, M.G., Curtiss, M., Keener, J.P., y Babst, M. 2014. Binding to Any ESCRT Can Mediate Ubiquitin-Independent Cargo Sorting. *Traffic* 15: 212–229.
- Margis, R., Margis, R., y Rieder, C.R.M. 2011. Identification of blood microRNAs associated to Parkinson's disease. *J. Biotechnol.* 152: 96–101.
- Marsh, J.J. y Lebherz, H.G. 1992. Fructose-bisphosphate aldolases: an evolutionary history. *Trends Biochem. Sci.* 17: 110–113.
- McEwen, B.S. 2006. Protective and damaging effects of stress mediators: Central role of the brain. *Dialogues Clin. Neurosci.* 8: 367–381.

- McEwen, B.S., Bowles, N.P., Gray, J.D., Hill, M.N., Hunter, R.G., Karatsoreos, I.N., and Nasca, C. 2015. Mechanisms of stress in the brain. *Nat. Neurosci.* 18: 1353–1363.
- Medina, A., Watson, S.J., Bunney, W., Myers, R.M., Schatzberg, A., Barchas, J., Akil, H., y Thompson, R.C. 2016. Evidence for alterations of the glial syncytial function in major depressive disorder. *J. Psychiatr. Res.* 72: 15–21.
- Melo, S.A. y cols., 2014. Cancer Exosomes Perform Cell-Independent MicroRNA Biogenesis and Promote Tumorigenesis. *Cancer Cell* 26: 707–721.
- Merkulova, M., Hurtado-Lorenzo, A., Hosokawa, H., Zhuang, Z., Brown, D., Ausiello, D. a, y Marshansky, V. 2011. Aldolase directly interacts with ARNO and modulates cell morphology and acidic vesicle distribution. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 300: C1442–C1455.
- Michlewski, G. y Cáceres, J.F. 2010. Antagonistic role of hnRNP A1 and KSRP in the regulation of let-7a biogenesis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17: 1011–1018.
- Mittelbrunn, M., Gutiérrez-Vázquez, C., Villarroya-Beltri, C., González, S., Sánchez-Cabo, F., González, M.Á., Bernad, A., y Sánchez-Madrid, F. 2011. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat. Commun.* 2: 282.
- Mohan, R. y John, A. 2015. Microtubule-associated proteins as direct crosslinkers of actin filaments and microtubules. *IUBMB Life* 67: 395–403.
- Montecalvo, A. y cols., 2012. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood* 119: 756–766.
- Mor, E., Cabilly, Y., Goldshmit, Y., Zalts, H., Modai, S., Edry, L., Elroy-Stein, O., y Shomron, N. 2011. Species-specific microRNA roles elucidated following astrocyte activation. *Nucleic Acids Res.* 39: 3710–23.
- Mukai, T., Yatsuki, H., Masuko, S., Arai, Y., Joh, K., y Hori, K. 1991. The structure of the brain-specific rat aldolase C gene and its regional expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 174: 1035–1042.
- Mulcahy, L.A., Pink, R.C., y Carter, D.R.F. 2014. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J. Extracell. vesicles* 3: 1–14.
- van Niel, G., Charrin, S., Simoes, S., Romao, M., Rochin, L., Saftig, P., Marks, M.S., Rubinstein, E., y Raposo, G. 2011. The Tetraspanin CD63 Regulates ESCRT-Independent and -Dependent Endosomal Sorting during Melanogenesis. *Dev. Cell* 21: 708–721.

Noiges, R., Eichinger, R., Kutschera, W., Fischer, I., Nemeth, Z., Wiche, G., y Propst, F. 2002. Microtubule-associated protein 1A (MAP1A) and MAP1B: light chains determine distinct functional properties. *J. Neurosci.* 22: 2106–2114.

Ohmori, T., Hirashima, Y., Kurimoto, M., Endo, S., y Takaku, A. 1996. In vitro hypoxia of cortical and hippocampal CA1 neurons: glutamate, nitric oxide, and platelet activating factor participate in the mechanism of selective neural death in CA1 neurons. *Brain Res* 743: 109–115.

Pan, B.T. y Johnstone, R.M. 1983. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell* 33: 967–978.

Pan, B.T., Teng, K., Wu, C., Adam, M., y Johnstone, R.M. 1985. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J. Cell Biol.* 101: 942–948.

Papagiannakopoulos, T., Shapiro, A., y Kosik, K.S. 2008. MicroRNA-21 targets a network of key tumor-suppressive pathways in glioblastoma cells. *Cancer Res.* 68: 8164–8172.

Park, M. y Shen, K. 2012. WNTs in synapse formation and neuronal circuitry. *EMBO J.* 31: 2697–2704.

Parolini, I. y cols., 2009. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *J. Biol. Chem.* 284: 34211–34222.

Pegtel, D.M., Cosmopoulos, K., Thorley-Lawson, D.A., van Eijndhoven, M.A.J., Hopmans, E.S., Lindenberg, J.L., de Gruijl, T.D., Würdinger, T., y Middeldorp, J.M. 2010. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107: 6328–6333.

Perea, G., Navarrete, M., y Araque, A. 2009. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci.* 32: 421–431.

Perea, G., Sur, M., y Araque, A. 2014. Neuron-glia networks: integral gear of brain function. *Front. Cell. Neurosci.* 8: 378.

Perkins, D.O., Jeffries, C.D., Jarskog, L.F., Thomson, J.M., Woods, K., Newman, M. a, Parker, J.S., Jin, J., y Hammond, S.M. 2007. microRNA expression in the prefrontal cortex of individuals with schizophrenia and schizoaffective disorder. *Genome Biol.* 8: R27.

Perrier, E., Pompei, F., Ruberto, G., Vassos, E., Collier, D., y Frangou, S. 2011. Initial evidence for the role of CACNA1C on subcortical brain morphology in patients with bipolar disorder. *Eur. Psychiatry* 26: 135–137.

Pfeffer, S.R. 2010. Two Rab3s for exosome release. *Nat. Cell Biol.* 12: 3–4.

- Pirttimaki, T.M., Hall, S.D., y Parri, H.R. 2011. Sustained neuronal activity generated by glial plasticity. *J. Neurosci.* 31: 7637–7647.
- Pols, M.S. y Klumperman, J. 2009. Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Exp. Cell Res.* 315: 1584–1592.
- Poria, D.K., Guha, A., Nandi, I., y Ray, P.S. 2016. RNA-binding protein HuR sequesters microRNA-21 to prevent translation repression of proinflammatory tumor suppressor gene programmed cell death 4. *Oncogene* 35: 1703–1715.
- Pribiag, H., Peng, H., Shah, W.A., Stellwagen, D., y Carbonetto, S. 2014. Dystroglycan mediates homeostatic synaptic plasticity at GABAergic synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111: 6810–5.
- Proia, P., Schiera, G., Mineo, M., Ingrassia, a. M.R., Santoro, G., Savettieri, G., y Di Liegro, I. 2008. Astrocytes shed extracellular vesicles that contain fibroblast growth factor-2 and vascular endothelial growth factor. *Int. J. Mol. Med.* 21: 63–67.
- Pryer, N.K., Walker, R. a, Skeen, V.P., Bourns, B.D., Soboeiro, M.F., y Salmon, E.D. 1992. Brain microtubule-associated proteins modulate microtubule dynamic instability in vitro. Real-time observations using video microscopy. *J. Cell Sci.* 103 Pt 4: 965–976.
- Putz, U., Howitt, J., Doan, A., Goh, C.-P., Low, L.-H., Silke, J., y Tan, S.-S. 2012. The Tumor Suppressor PTEN Is Exported in Exosomes and Has Phosphatase Activity in Recipient Cells. *Sci. Signal.* 5: ra70–ra70.
- Rajkowska, G. y Stockmeier, C.A. 2013. Astrocyte pathology in major depressive disorder: insights from human postmortem brain tissue. *Curr. Drug Targets* 14: 1225–36.
- Ramírez, G., Toro, R., Döbeli, H., y Von Bernhardi, R. 2005. Protection of rat primary hippocampal cultures from A $\beta$  cytotoxicity by pro-inflammatory molecules is mediated by astrocytes. *Neurobiol. Dis.* 19: 243–254.
- Raposo, G., Nijman, H.W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C. V, Melief, C.J., y Geuze, H.J. 1996. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.* 183: 1161–1172.
- Rosen, G.D., Bai, J., Wang, Y., Fiondella, C.G., Threlkeld, S.W., Loturco, J.J., y Galaburda, A.M. 2007. Disruption of neuronal migration by RNAi of *Dyx1c1* results in neocortical and hippocampal malformations. *Cereb. Cortex* 17: 2562–2572.
- Rousselet, A., Autillo-Touati, A., Araud, D., y Prochiantz, A. 1990. In vitro regulation of neuronal morphogenesis and polarity by astrocyte-derived factors. *Dev Biol* 137: 33–45.

Le Roux, P.D. y Reh, T. 1994. Regional differences in glial-derived factors that promote dendritic outgrowth from mouse cortical neurons in vitro. *J. Neurosci.* 14: 4639–4655.

Sahu, R., Kaushik, S., Clement, C.C., Cannizzo, E.S., Scharf, B., Follenzi, A., Potolicchio, I., Nieves, E., Cuervo, A.M., y Santambrogio, L. 2011. Microautophagy of Cytosolic Proteins by Late Endosomes. *Dev. Cell* 20: 131–139.

Sandoval, M., Luarte, A., Herrera-Molina, R., Varas-Godoy, M., Santibáñez, M., Rubio, F.J., Smit, A.B., Gundelfinger, E.D., Li, K.W., Smalla, K.H., y Wyneken, U. 2013. The glycolytic enzyme aldolase C is up-regulated in rat forebrain microsomes and in the cerebrospinal fluid after repetitive fluoxetine treatment. *Brain Res.* 1520: 1–14.

Sandoval, R., González, A., Caviedes, A., Pancetti, F., Smalla, K.H., Kaehne, T., Michea, L., Gundelfinger, E.D., y Wyneken, U. 2011. Homeostatic NMDA receptor down-regulation via brain derived neurotrophic factor and nitric oxide-dependent signalling in cortical but not in hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 118: 760–772.

Savina, A., Furlán, M., Vidal, M., y Colombo, M.I. 2003. Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *J. Biol. Chem.* 278: 20083–20090.

Scales, T.M.E., Lin, S., Kraus, M., Goold, R.G., y Gordon-Weeks, P.R. 2009. Nonprimed and DYRK1A-primed GSK3 beta-phosphorylation sites on MAP1B regulate microtubule dynamics in growing axons. *J. Cell Sci.* 122: 2424–2435.

Shi, L., Ko, M.L., y Ko, G.Y.-P. 2009. Rhythmic expression of microRNA-26a regulates the L-type voltage-gated calcium channel  $\alpha_1C$  subunit in chicken cone photoreceptors. *J. Biol. Chem.* 284: 25791–803.

Sholl, D.A. 1953. Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J. Anat.* 87: 387.

Sibille, J., Pannasch, U., y Rouach, N. 2014. Astroglial potassium clearance contributes to short-term plasticity of synaptically evoked currents at the tripartite synapse. *J. Physiol.* 592: 87–102.

Simons, M. y Raposo, G. 2009. Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21: 575–581.

Skog, J., Würdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D.H., Gainche, L., Sena-Esteves, M., Curry, W.T., Carter, B.S., Krichevsky, A.M., y Breakefield, X.O. 2008. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat. Cell Biol.* 10: 1470–1476.

- Smirnova, L., Gräfe, a, Seiler, a, Schumacher, S., Nitsch, R., y Wulczyn, F.G. 2005. Regulation of miRNA expression during neural cell specification. *Eur J Neurosci* 21: 1469–1477.
- Soares, A.R., Martins-Marques, T., Ribeiro-Rodrigues, T., Ferreira, J.V., Catarino, S., Pinho, M.J., Zuzarte, M., Isabel Anjo, S., Manadas, B., P.G. Sluijter, J., Pereira, P., y Girao, H. 2015. Gap junctional protein Cx43 is involved in the communication between extracellular vesicles and mammalian cells. *Sci. Rep.* 5: 13243.
- Sokolova, V., Ludwig, A.-K., Hornung, S., Rotan, O., Horn, P.A., Epple, M., y Giebel, B. 2011. Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 87: 146–50.
- van Spronsen, M., van Battum, E.Y., Kuijpers, M., Vangoor, V.R., Rietman, M.L., Pothof, J., Gumy, L.F., van IJcken, W.F.J., Akhmanova, A., Pasterkamp, R.J., y Hoogenraad, C.C. 2013. Developmental and Activity-Dependent miRNA Expression Profiling in Primary Hippocampal Neuron Cultures. *PLoS One* 8: e74907.
- Squadrito, M.L., Baer, C., Burdet, F., Maderna, C., Gilfillan, G.D., Lyle, R., Ibberson, M., y De Palma, M. 2014. Endogenous RNAs Modulate MicroRNA Sorting to Exosomes and Transfer to Acceptor Cells. *Cell Rep.* 8: 1432–1446.
- Stefanizzi, I. y Cañete-Soler, R. 2007. Coregulation of light neurofilament mRNA by poly(A)-binding protein and aldolase C: Implications for neurodegeneration. *Brain Res.* 1139: 15–28.
- Subra, C., Grand, D., Laulagnier, K., Stella, A., Lambeau, G., Paillasse, M., De Medina, P., Monsarrat, B., Perret, B., Silvente-Poirot, S., Poirot, M., and Record, M. 2010. Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. *J. Lipid Res.* 51: 2105–2120.
- Suh, J.H., Choi, E., Cha, M.J., Song, B.W., Ham, O., Lee, S.Y., Yoon, C., Lee, C.Y., Park, J.H., Lee, S.H., y Hwang, K.C. 2012. Up-regulation of miR-26a promotes apoptosis of hypoxic rat neonatal cardiomyocytes by repressing GSK-3 $\beta$  protein expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 423: 404–410.
- Svensson, K.J., Christianson, H.C., Wittrup, A., Bourseau-Guilmain, E., Lindqvist, E., Svensson, L.M., Mörgelin, M., y Belting, M. 2013. Exosome uptake depends on ERK1/2-heat shock protein 27 signaling and lipid Raft-mediated endocytosis negatively regulated by caveolin-1. *J. Biol. Chem.* 288: 17713–24.
- Sverdlov, E.D. 2012. Amedeo Avogadro's cry: What is 1  $\mu$ g of exosomes? *Bioessays* 34: 873–875.



- Szebenyi, G., Bollati, F., Bisbal, M., Sheridan, S., Faas, L., Wray, R., Haferkamp, S., Nguyen, S., Caceres, A., y Brady, S.T. 2005. Activity-driven dendritic remodeling requires microtubule-associated protein 1A. *Curr. Biol.* 15: 1820–1826.
- Tan, C.Y., Lai, R.C., Wong, W., Dan, Y.Y., Lim, S.-K., y Ho, H.K. 2014. Mesenchymal stem cell-derived exosomes promote hepatic regeneration in drug-induced liver injury models. *Stem Cell Res. Ther.* 5: 76.
- Tau, G.Z. y Peterson, B.S. 2010. Normal development of brain circuits. *Neuropsychopharmacology* 35: 147–168.
- Taylor, A.R., Robinson, M.B., Gifondorwa, D.J., Tytell, M., y Milligan, C.E. 2007. Regulation of heat shock protein 70 release in astrocytes: Role of signaling kinases. *Dev. Neurobiol.* 67: 1815–1829.
- Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., y Clayton, A. 2006. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr. Protoc. Cell Biol.* Chapter 3: Unit 3.22.
- Théry, C., Zitvogel, L., y Amigorena, S. 2002a. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 569–579.
- Théry, C., Zitvogel, L., y Amigorena, S. 2002b. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 569–579.
- Thompson, R.J., Kynoch, P.A.M., y Willson, V.J.C. 1982. Cellular localization of aldolase C subunits in human brain. *Brain Res.* 232: 489–493.
- Thomson, D.W. y Dinger, M.E. 2016. Endogenous microRNA sponges: evidence and controversy. *Nat. Rev. Genet.* 17: 272–283.
- Tian, T., Zhu, Y.L., Hu, F.H., Wang, Y.Y., Huang, N.P., y Xiao, Z.D. 2013. Dynamics of exosome internalization and trafficking. *J. Cell. Physiol.* 228: 1487–1495.
- Tian, T., Zhu, Y.L., Zhou, Y.Y., Liang, G.F., Wang, Y.Y., Hu, F.H., y Xiao, Z.D. 2014. Exosome uptake through clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis and mediating miR-21 delivery. *J. Biol. Chem.* 289: 22258–22267.
- Tomari, Y., Du, T., y Zamore, P.D. 2007. Sorting of *Drosophila* Small Silencing RNAs. *Cell* 130: 299–308.
- Tortosa, E., Montenegro-Venegas, C., Benoist, M., Härtel, S., González-Billault, C., Esteban, J. a., y Avila, J. 2011. Microtubule-associated protein 1B (MAP1B) is required for dendritic spine development and synaptic maturation. *J. Biol. Chem.* 286: 40638–40648.

- Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brügger, B., y Simons, M. 2008. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* 319: 1244–1247.
- Tsilioni, I., Panagiotidou, S., y Theoharides, T.C. 2014. Exosomes in neurologic and psychiatric disorders. *Clin. Ther.* 36: 882–888.
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J., y Lötvall, J.O. 2007a. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* 9: 654–659.
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J., y Lötvall, J.O. 2007b. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* 9: 654–659.
- Vella, L.J., Sharples, R.A., Lawson, V.A., Masters, C.L., Cappai, R., y Hill, A.F. 2007. Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of PrP processing. *J. Pathol.* 211: 582–590.
- Villarroya-Beltri, C., Gutiérrez-Vázquez, C., Sánchez-Cabo, F., Pérez-Hernández, D., Vázquez, J., Martín-Cofreces, N., Martínez-Herrera, D.J., Pascual-Montano, A., Mittelbrunn, M., y Sánchez-Madrid, F. 2013. Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat. Commun.* 4: 2980.
- Vio, K., Rodríguez, S., Yulis, C.R., Oliver, C., y Rodríguez, E.M. 2008. The subcommissural organ of the rat secretes Reissner's fiber glycoproteins and CSF-soluble proteins reaching the internal and external CSF compartments. *Cerebrospinal Fluid Res.* 5: 3.
- Volker, K.W. y Knull, H. r 1997. A glycolytic enzyme binding domain on tubulin. *Arch. Biochem. Biophys.* 338: 237–243.
- Walther, E.U., Dichgans, M., Maricich, S.M., Romito, R.R., Yang, F., Dziennis, S., Zackson, S., Hawkes, R., y Herrup, K. 1998. Genomic sequences of aldolase C (Zebirin II) direct lacZ expression exclusively in non-neuronal cells of transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95: 2615–2620.
- Wang, D.D. y Bordey, A. 2008. The astrocyte odyssey. *Prog. Neurobiol.* 86: 342–67.
- Wang, S., Cesca, F., Loers, G., Schweizer, M., Buck, F., Benfenati, F., Schachner, M., y Kleene, R. 2011. Synapsin I is an oligomannose-carrying glycoprotein, acts as an oligomannose-binding lectin, and promotes neurite outgrowth and neuronal survival when released via glia-derived exosomes. *J. Neurosci.* 31: 7275–90.

Wilkinson, M.B. y cols., 2011. A novel role of the WNT-dishevelled-GSK3 $\beta$  signaling cascade in the mouse nucleus accumbens in a social defeat model of depression. *J. Neurosci.* 31: 9084–92.

Willson, V.J., Graham, J.G., McQueen, I.N., y Thompson, R.J. 1980. Immunoreactive aldolase C in cerebrospinal fluid of patients with neurological disorders. *Ann. Clin. Biochem.* 17: 110–113.

Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R.I., y Diederichs, S. 2009. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat. Cell Biol.* 11: 228–234.

Xiao, L., Qi, A., y Chen, Y. 2005. Cultured embryonic hippocampal neurons deficient in glucocorticoid (GC) receptor: a novel model for studying nongenomic effects of GC in the neural system. *Endocrinology* 146: 4036–41.

Xiao, M. y Hu, G. 2014. Involvement of Aquaporin 4 in Astrocyte Function and Neuropsychiatric Disorders. *CNS Neurosci. Ther.* 20: 385–390.

Xin, H., Li, Y., Buller, B., Katakowski, M., Zhang, Y., Wang, X., Shang, X., Zhang, Z.G., y Chopp, M. 2012. Exosome-mediated transfer of miR-133b from multipotent mesenchymal stromal cells to Xin, H. y cols., 2012. Exosome-mediated transfer of miR-133b from multipotent mesenchymal stromal cells to neural cells contributes to neurite outgrowth. *Stem Cells*, 30(7),. *Stem Cells* 30: 1556–1564.

Xu, Y.Z., Di Marco, S., Gallouzi, I., Rola-Pleszczynski, M., y Radzioch, D. 2005. RNA-binding protein HuR is required for stabilization of SLC11A1 mRNA and SLC11A1 protein expression. *Mol. Cell. Biol.* 25: 8139–49.

Zeng, J., Li, M., Xiao, Z., Chen, Y., Chang, Q., Tian, H., Jin, H., y Liu, X. 2013. Rapid elevation of calcium concentration in cultured dorsal spinal cord astrocytes by corticosterone. *Neurochem. Res.* 38: 382–388.

Zhang, L. y cols., 2015. Microenvironment-induced PTEN loss by exosomal microRNA primes brain metastasis outgrowth. *Nature* 527: 100–4.

Zheng, L.-S., Ishii, Y., Zhao, Q.-L., Kondo, T., y Sasahara, M. 2013. PDGF suppresses oxidative stress induced Ca<sup>2+</sup> overload and calpain activation in neurons. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013: 367206.