



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría en Ciencias Bioquímicas

Papel de la Autofagia en el Establecimiento de la Senescencia en un Modelo de Senescencia Cortical *in vitro*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Daniel Moreno Blas

TUTOR PRINCIPAL

Susana Castro Obregón
Instituto de Fisiología Celular

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Lourdes Massieu Trigo, Instituto de Fisiología Celular
Mina Konigsberg Fainstein, Universidad Autónoma Metropolitana

Ciudad de México, enero, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

“I work to cure aging, and I think you should too, because I feel that saving lives is the most valuable thing anyone can spend their time doing, and since over 100, 000 people die every single day of causes that young people essentially never die of, you’ll save more lives by helping to cure aging than in any other way”.

- Aubrey de Grey

Este trabajo se desarrolló en el Departamento de Neurodesarrollo y Fisiología, en la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular, bajo la tutoría de la Dra. Susana Castro Obregón. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico de la beca CONACyT 588372, y de los proyectos PAPIIT-UNAM IN209112, IN206015 y CONACyT CB2013-220515.

Dedicatoria

A mis padres Javier y Gloria que siempre han estado a mi lado. Por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida. Por los valores que me han inculcado y sobre todo por ser un excelente ejemplo de vida a seguir. A mis hermanos Javier, Omar y Yessica por estar siempre presentes, acompañándome.

Agradecimientos

En primer lugar agradezco a la Dra. Susana Castro Obregón por aceptarme en su equipo de trabajo y permitirme trabajar en esta línea de investigación, por su apoyo, por compartir su conocimiento y por su guía durante el desarrollo de mi tesis.

A la Dra. Lourdes Massieu y la Dra. Mina Konigsberg miembros del Comité Tutoral y quienes contribuyeron con sus observaciones durante el desarrollo del trabajo aquí presentado.

A la Dra. Beatriz Aguilar Maldonado por su apoyo brindado como “Técnico Académico” del laboratorio.

Al M. en C. Cristian Gerónimo Olvera estudiante de doctorado del laboratorio de la Dra. Lourdes Massieu quien me enseñó a realizar el cultivo primario de tejido cortical de rata Wistar.

Al Ing. Aurey Galván Lobato y al Ing. Manuel Ordñez Benavides del Taller de Mantenimiento Electrónico, Eléctrico y Mecánico del Instituto de Fisiología Celular (IFC) por mantener en buen estado el funcionamiento de los equipos del laboratorio.

A la comunidad del IFC por brindar su apoyo cuando necesitaba algún reactivo, material o equipo para realizar mis experimentos.

A Gabriel, Bety, Pilar, Abiram, Zaida, Jorge y Elisa por su ayuda y orientación en la realización de mis experimentos y por su excelente amistad.

Al “Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado” (PAEP) por el apoyo brindado para mi asistencia al V Congreso de Especies Reactivas del Oxígeno en Biología y Medicina llevado a cabo en la ciudad de Morelos.

Al programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, en particular a Leticia García por el excelente apoyo administrativo brindado.

ÍNDICE

Abstract	8
Resumen	9
Abreviaturas	10
1. Introducción	11
1.1. Envejecimiento	11
1.2. Senescencia Celular	11
1.2.1. Senescencia Celular e Inflamación	14
1.3. Autofagia	14
1.4. Tipos de Autofagia	14
1.5. Autofagia Mediada por Chaperonas	15
1.6. Microautofagia.....	15
1.7. Macroautofagia.....	16
1.8. Maquinaria Central de la Macroautofagia.....	16
1.9. Funciones de la Autofagia	18
1.10. Autofagia y Senescencia Celular.....	19
1.11. Senescencia Neuronal y Autofagia	20
2. Hipótesis	21
3. Objetivo general	21
4. Objetivos particulares	22
5. Estrategia experimental	23
6. Material y métodos	23
6.1. Cultivo de tejido cortical de rata Wistar	23
6.2. Conteo celular y edición de imágenes.....	24
6.3. Actividad SA-β-gal.....	24
6.4. Detección de lipofuscina.....	24
6.5. Tinción con Sudan Black B (SBB)	24
6.6. Detección de radical superóxido	25
6.7. Inmunofluorescencia	25
6.8. Detección autofagosomas con Cyto ID	25
6.9. Obtención de medio condicionado	25

6.10. Tratamiento de células corticales con Spautin-1	26
6.11. Western blot	26
7. Resultados	26
7.1. Establecimiento del modelo de senescencia neuronal en cultivos de células corticales prenatales de rata	26
7.1.1. El cultivo cortical permanece viable hasta 40 DIV con proliferación constante de glía.	26
7.1.2. El cultivo primario cortical adquiere actividad SA- β -gal y acumula lipofuscina.	27
7.1.3. Las neuronas y no la glía, muestran focos de daño al DNA cuando senescen.	29
7.1.4. La expresión del supresor tumoral p21 incrementa en neuronas corticales senescentes.	30
7.1.5. La expresión de IL6 incrementa en neuronas corticales senescentes antes que en la glía.	30
7.1.6. Producción de superóxido incrementa en células corticales de 26 DIV	32
7.2. Las células corticales inducen senescencia de manera parácrina	32
7.3. El flujo de la autofagia se interrumpe en la senescencia cortical.....	34
7.4 La inhibición de la autofagia en células jóvenes aumenta el número de células senescentes.	36
8. Discusión	39
9. Conclusiones	41
10. Perspectivas	41
11. Literatura citada	42
12. Anexo 1 Protocolo detallado del cultivo cortical.....	47
13. Anexo 2 Protocolo detallado para detectar actividad SA-βGal	52
14. Anexo 3 Protocolo detallado para inmunofluorescencia.....	54

The role of autophagy in the establishment of the senescence in a model of cortical senescence *in vitro*

Abstract

Cellular senescence is a state in which cells have an irreversible cell cycle arrest and acquire a specific phenotype characterized by an increase in cell size, senescence-associated β -galactosidase activity (SA- β -gal), senescence-associated heterochromatin foci, DNA damage foci and accumulation of lipofuscin. Senescent cells remain metabolically active, and if they stay for a long period of time develop a complex senescence associated secretory phenotype (SASP). SASP has the ability to change the microenvironment surrounding the senescent cell because proinflammatory cytokines, chemokines, growth factors and proteases are secreted. Various stimuli that cause genomic stress or derepression of INK4/ARF locus induce senescence in mitotic cells. In post-mitotic cells little is known about its specific phenotype and inducers.

Understanding how cells become senescents is relevant for both, normal physiology, as senescent cells are involved in embryonic morphogenesis and wound healing, and in pathology, as they are also present in malignant lesions and accumulate during aging in various organs, including the brain, apparently contributing to the development of aging-related diseases.

Autophagy is a catabolic process that, through lysosomes, degrades intracellular components into basic biomolecules, which are then recycled into the cytosol or secreted by the cell. Autophagy influences a variety of cellular processes such as proliferation, differentiation, cell death and senescence, in a still to understand mechanism. Some reports indicate that autophagy is necessary for the secretion of SASP in a model of oncogene-induced senescence, while other reports show that autophagy prevents senescence. The aim of this study was to analyze the role of autophagy in the establishment of cortical senescence. Therefore, we developed an *in vitro* model of senescence of primary cultures of prenatal rat cortex that reproduces the senescent features observed in old mouse brains. We found that neurons undergo senescence before glial cells, which is a surprising observation, as the assumption is the opposite, that glial senescence is what damage neurons. More important, senescent neurons secrete SASP able to induce paracrine premature neural senescence before glia does. This is a novel and important observation because it is thought that glial cells are the main cause of inflammation and functional impairment of neurons.

During neuronal and glial senescence, autophagy flux is impaired. Inhibiting autophagy before the acquisition of senescent phenotype decreases the number of senescent neuronal cells, suggesting that autophagy dysfunction contributes to the establishment of neuronal senescence.

Keywords: Aging, Autophagy, Neuronal senescence, SASP, TASC.

Papel de la Autofagia en el Establecimiento de la Senescencia en un Modelo de Senescencia Cortical *in vitro*

Resumen

La senescencia celular es un estado en el cual las células tienen una inhibición irreversible del ciclo celular y adquieren características particulares como incremento de tamaño celular, aumento de la actividad de la enzima β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -gal), formación de focos de heterocromatina asociados a senescencia, focos de daño al DNA y acumulación de lipofuscina. Cuando las células senescentes permanecen por largo tiempo, adquieren un complejo fenotipo de secreción (SASP por sus siglas en inglés). El SASP modifica el microambiente circundante a la célula senescente, ya que se secretan citocinas proinflamatorias, quimiocinas, factores de crecimiento y proteasas. Diversos estímulos que causan estrés genómico, así como la des-represión del locus INK4/ARF, inducen la senescencia en células mitóticas. En células post-mitóticas poco se ha estudiado.

Es fundamental entender las señales inductoras y la fisiología de la senescencia, ya que células senescentes participan en la morfogénesis del embrión y en la cicatrización. También están presentes en lesiones malignas y se acumulan durante el envejecimiento en diversos órganos, incluido el cerebro, con lo que parecen contribuir al desarrollo de enfermedades asociadas al envejecimiento.

La autofagia es un proceso catabólico que degrada componentes intracelulares a través de los lisosomas, convirtiéndolos en biomoléculas básicas que después serán recicladas en el citosol o secretadas por la célula. Esta característica permite a la autofagia influir en procesos celulares como proliferación, diferenciación, muerte celular y la senescencia, aunque aún no se entiende como. Algunos reportes describen que la autofagia participa en el establecimiento del SASP, aunque en otros la autofagia parece prevenir la senescencia. El objetivo de este estudio es analizar el papel de la autofagia en el establecimiento de la senescencia neuronal. Para ello desarrollamos un modelo de senescencia *in vitro* de cultivos primarios de corteza neonatal de rata que reproduce las características observadas en cerebros viejos.

Descubrimos que las neuronas senescen antes que la glía y secretan moléculas que inducen senescencia neuronal prematura parácrina. Esta observación es novedosa e importante porque se creía que las células gliales son la principal causa de inflamación y deficiencia funcional de las neuronas.

Además, encontramos que el flujo de la autofagia se interrumpe durante la senescencia, y al inhibirla disminuye el número de neuronas senescentes, sugiriendo que la disfunción de la autofagia contribuye al establecimiento de la senescencia neuronal.

Palabras Clave: Envejecimiento, Autofagia, Senescencia Neuronal, SASP, TASC.

Abreviaturas

ATG	Gen relacionado a autofagia
ATM	Ataxia telangiectasia mutado
BSA	Albúmina de suero bovino
CDK	Cinasa dependiente de ciclina
CMA	Autofagia mediada por chaperonas
DIV	Días <i>in vitro</i>
FIP200	Proteína de interacción focal
GFAP	Proteína gliofibrilar ácida
HDF	Fibroblastos diploides humanos
HE	Hidroetidina
HP1	Proteína de heterocromatina 1
Hsc	Proteína de choque térmico citosólica
IL6	Interleucina 6
IL8	Interleucina 8
LAMP2	Proteína de membrana asociada a lisosoma tipo 2
LC3	Proteína de cadena ligera 3 asociada a microtúbulos
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
MMP	Metaloproteinasas de matriz extracelular
mTOR	Blanco mecánico de la rapamicina
NF-κB	Factor nuclear kappa B
OIS	Senescencia inducida por oncogenes
PI3KC3	Fosfatidil-inositol-3-cinasa clase 3
P53BP	Proteína de unión a p53
PE	Fosfatidiletanolamina
PLL	Poli-L-lisina
PBS	Tampón fosfato salino
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RIS	Senescencia inducida por oncogenes
SA-β-gal	β-galactosidasa asociada a senescencia
SAHF	Focos de heterocromatina asociados a senescencia
SASP	Fenotipo de secreción asociado a senescencia
SBB	Sudan Black B
SNARE	Receptor de la proteína unida a NSF soluble
TASCC	Compartimento de acoplamiento espacial TOR-Autofagia
TIF	Disfunción de telómeros
TUJ-1	Anticuerpo anti-beta-III-tubulin
ULK	Cinasa tipo UNC-51

1. Introducción

1.1. Envejecimiento

El envejecimiento es un proceso biológico complejo caracterizado por la acumulación de daño a nivel molecular, celular y tisular a lo largo del tiempo, lo cual conduce a la pérdida de la función del organismo propiciando una mayor vulnerabilidad a las enfermedades y concluye con la muerte (Fontana *et al.*, 2010). Además, el envejecimiento es el principal factor de riesgo para muchas condiciones patológicas como sarcopenia, enfermedades cardiovasculares, cáncer, enfermedades neurodegenerativas, osteoporosis, obesidad, depresión diabetes, entre otras (de Cabo *et al.*, 2014).

En México el número de personas adultas mayores está incrementando rápidamente, en el 2010 la población de mayores de 60 años de edad, representaba el 31% de la población (INEGI, 2012). Pero se ha estimado que siguiendo esta tendencia, dentro de 20 años, el número de personas adultas mayores sobrepasará el número de personas jóvenes y México apenas empieza a considerar contar con las herramientas suficientes como la infraestructura adecuada, sistemas de salud enfocada al cuidado y atención de ancianos, o la educación necesaria para enfrentar este problema. Por lo tanto es de gran importancia el estudio de la biología del envejecimiento y su relación con las enfermedades, para así poder incrementar el tiempo de vida saludable de los ciudadanos y con ello mejorar la calidad de vida de toda la población mexicana.

López Otín y varios investigadores (2013) propusieron 9 características que definen y contribuyen al proceso del envejecimiento: Inestabilidad genómica, desgaste de los telómeros, alteraciones epigenéticas, pérdida de proteostasis, desregulación de los sensores de nutrientes, disfunción mitocondrial, senescencia celular, agotamiento de células troncales y comunicación intercelular alterada (López *et al.*, 2013). De todas ellas, la senescencia celular es una característica muy importante asociada al envejecimiento, ya que se ha observado un incremento en el número de células senescentes en tejido mitótico de primates con edad avanzada (Herbig *et al.*, 2006) y a su vez, está acumulación de células senescentes se ha asociado con muchas enfermedades relacionadas a la tercera edad (van Deursen, 2014).

1.2. Senescencia Celular

La senescencia celular tiene una relevancia funcional en varios contextos patofisiológicos. Tiene efectos patológicos en el envejecimiento y enfermedades relacionadas, en la inflamación y en la reparación de tejidos (Salama *et al.*, 2014). Sin embargo también tiene papeles fisiológicos, ya que se ha descrito recientemente que la senescencia contribuye a la morfogénesis en el desarrollo embrionario (Muñoz *et al.*, 2013; Storer *et al.*, 2013) y en la cicatrización (Jun & Lau, 2010).

La senescencia celular es un estado en el cual las células pierden permanentemente la capacidad para dividirse, son resistentes a estímulos mitóticos y apoptóticos, y permanecen metabólicamente activas por periodos prolongados de tiempo, adquiriendo características fenotípicas que definen el estado senescente (Rodier & Campisi, 2011; van Deursen, 2014). Estas

características varían en función del tipo celular, naturaleza del estrés y contexto celular (Young *et al.*, 2013), que se resumen a continuación:

- i. **Detención permanente del ciclo celular.** Comúnmente involucra la inhibición prolongada de la actividad de las cinasas dependientes de ciclina (cdk) por la acción de las proteínas p21, p16 o ambas. p21 inhibe a la CDK2 y p16 inhibe al complejo CDK4/6, lo cual bloquea la inactivación de la proteína RB, resultando en represión continua de los genes blanco de E2F necesarios para el inicio de la fase S del ciclo celular (van Deursen, 2014).
- ii. **Incremento de tamaño celular.** Algunas veces incrementa hasta más de dos veces respecto al tamaño de las células no senescentes.
- iii. **Actividad de la enzima β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -gal).** El incremento en la actividad de esta enzima se ha usado como marcador de senescencia ya que una característica común en casi todos los tipos celulares que se han estudiado. Sin embargo, no parece tener una función fisiológica en la adquisición y establecimiento del fenotipo senescente, ya que su inhibición no reduce la senescencia (Lee *et al.*, 2006).
- iv. **Formación de focos de heterocromatina asociados a senescencia (SAHF).** Estos focos de heterocromatina están enriquecidos por marcas epigenéticas de represión como H3K9 tri-metilada, HP1 y macroH2A. Están involucrados en la inactivación de genes que codifican proteínas con función proliferativa (genes del ciclo celular) y por otro lado en la activación de genes que contribuyen a senescencia como genes del secretoma senescente (SASP, se describe adelante) (Salama *et al.*, 2014).
- v. **Focos de daño al DNA.** El daño al DNA, ya sea por rompimiento de la cadena doble o por desgaste de los telómeros, produce lo que se conoce como respuesta al daño (DDR) que se ha asociado a la senescencia por inducir detención del ciclo celular y la activación de las vías p53, p21 y la MAPK p38. Esta última a su vez, aumenta la actividad del factor de transcripción NF- κ B, el cual regula la expresión de una gran cantidad de genes, entre ellos citocinas proinflamatorias como IL6 e IL8 (Correia *et al.*, 2014). La respuesta al daño del DNA puede ser visualizada por marcadores específicos como 53BP1 y γ H2AX (Salama *et al.*, 2014).
- vi. **Acumulación de lipofuscina.**
La lipofuscina es material intralisosomal polimérico inespecífico, que contiene proteínas, lípidos, oligosacáridos, metales como zinc, manganeso y cobre, que no puede ser degradado por las hidrolasas de los lisosomas, ni ser secretado (Terman & Brunk, 2004; Jung *et al.*, 2010). Durante el envejecimiento y en estadios finales de senescencia, las células acumulan grandes cantidades de lipofuscina que no pueden ser eliminadas (Terman & Brunk, 2004). Una de las características de la lipofuscina es su autofluorescencia.
- vii) **Fenotipo de secreción asociado a senescencia (SASP).**

Las células senescentes son metabólicamente activas y además capaces de afectar al microambiente circundante mediante la secreción de una amplia gama de factores que colectivamente se conoce como secretoma o SASP (por su siglas en inglés que se *traduce* Fenotipo de secreción asociado a senescencia) (Kuilman & Peeper, 2009). Entre estos factores se encuentran numerosas citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, proteasas y especies reactivas de oxígeno (Kuilman & Peeper, 2009; Hoare & Narita, 2013). Las funciones del SASP se han descrito en cuatro áreas: (1) una función autócrina, que refuerza el fenotipo senescente de la célula secretora, (2) una función parácrina, que induce senescencia a las células normales circundantes a la célula secretora senescente, (3) un efecto inflamatorio, mediado por la infiltración de componentes del sistema inmune capaces de eliminar a las células senescentes y (4) un efecto pro-oncogénico sobre células transformadas o premalignas (Kuilman & Peeper, 2009).

Sin embargo, ninguna característica es completamente específica para el estado senescente, por lo tanto para definir una célula como senescente es necesario considerar múltiples marcadores en combinación (se resumen en la Tabla 1) (Salama *et al.*, 2014).

Tabla 1. Lista de algunos marcadores de senescencia
Carencia de proliferación celular
Morfología celular larga y aplanada
Actividad β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -gal)
Marcadores de heterocromatina (HP1, H3K9me3, macroH2A)
Focos inducidos por disfunción de telómeros (TIF)
Expresión de inhibidores de CDKs (p16, p21, etc.)
Respuesta de daño al DNA (ATM, 53BP1, γ H2AX)
Factores del SASP (IL6, IL8, MMPs, etc.)
Activación de p53
Reducción de lamina B1
Actividad transcripcional de NF- κ B
Activación de p38
Acumulación de lipofuscina (autofluorescencia o tinción con Sudán Black)

En células mitóticas una gran variedad de tipos de estrés, tanto extrínsecos como intrínsecos, activan el programa de senescencia celular, incluyendo daño al DNA, estrés oxidativo, desgaste de telómeros, activación oncogénica, inactivación de supresores de tumor, estrés epigenético, estrés del huso mitótico, entre otros. Estos factores de estrés participan en varias cascadas de señalización celular, pero en última instancia activan a p21, p53, p16^{INK4} o una combinación de ellos (van Deursen, 2014). Sin embargo, hasta la fecha, los

factores involucrados en la inducción de senescencia celular en células post-mitóticas como las neuronas se desconocen.

Que la expresión de p16^{INK4} sea característica de las células senescentes permitió demostrar el papel de la senescencia en el envejecimiento del organismo, ya que fue posible eliminar selectivamente a las células senescentes al generar ratones transgénicos (llamados INK-ATTAC) que expresan una variante de la Caspasa 8 bajo el control del promotor de p16^{INK4}. Dicha variante de la Caspasa 8 se activa solo cuando se induce su dimerización con la adición de una droga sintética. Al eliminar de forma inducible células senescentes, se logró retrasar en el ratón la disfunción asociada a la edad en tejido adiposo, músculo esquelético y del ojo (Baker *et al.*, 2011).

1.2.1. Senescencia celular e Inflamación

Las células senescentes son capaces de secretar una gran cantidad de citocinas proinflamatorias como Interleucina 6 (IL6) (Kuilman & Peeper, 2009; Hoare & Narita, 2013), lo cual provoca una inflamación crónica dentro de los tejidos de los organismo viejos (van Deursen, 2014). A su vez, la inflamación crónica está asociada con muchas enfermedades relacionadas al envejecimiento como enfermedades cardiovasculares, sarcopenia, cáncer, diabetes, así como en las enfermedades neurodegenerativas (Freund *et al.*, 2010). Sin embargo, aún no se ha encontrado una relación directa entre la senescencia celular y las enfermedades neurodegenerativas durante el envejecimiento.

Existe una hipótesis propuesta por Golde y Miller (2009), donde relacionan a la senescencia celular con las enfermedades neurodegenerativas. Ellos proponen que los agregados de proteínas mal plegadas son reconocidos como extraños por el sistema inmune innato y esto provoca inflamación, que a su vez induce senescencia celular. Las células senescentes, por medio del SASP, secretan citocinas proinflamatorias que refuerzan la inflamación ya establecida, creando un ciclo de senescencia-inflamación que da lugar a muerte neuronal y con ello a fallo cerebral y neurodegeneración (Golde & Miller, 2009). Golde y Miller también describen un mecanismo que se encuentra alterado y que forma parte de su hipótesis, la autofagia, cuya activación está asociada con la extensión del tiempo de vida en varios organismos modelo (Madeo *et al.*, 2015).

1.3. Autofagia

La autofagia es una vía de degradación lisosomal que realizan las células eucariontes que en general degrada componentes intracelulares en biomoléculas básicas, las cuales son después recicladas en el citosol o secretadas por la célula (Wirawan *et al.*, 2012).

1.4. Tipos de Autofagia

Basado en las diferentes maneras para introducir el material citoplásmico al lumen del lisosoma, se han descrito tres principales mecanismos de autofagia

en células de mamíferos: **autofagia mediada por chaperonas, microautofagia y macroautofagia (figura 1)** (Wirawan *et al.*, 2012).

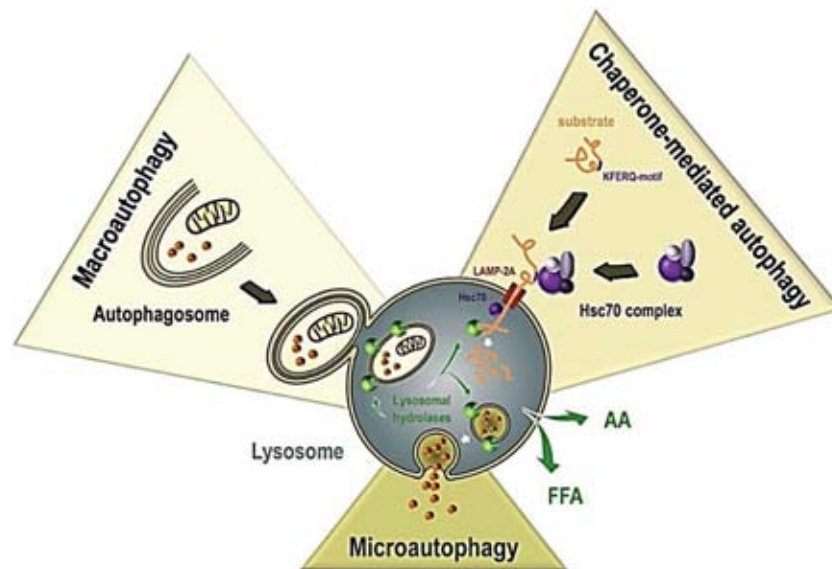


Figura 1. Representación esquemática de los diferentes tipos de autofagia (Tomada de Wirawan *et al.*, 2012).

1.5. Autofagia Mediada por Chaperonas

La autofagia mediada por chaperonas (“CMA” por sus siglas en inglés) es un tipo de autofagia, activada por diferentes tipos de estrés, tales como estrés nutricional, exposición a compuestos tóxicos y estrés oxidante. Bajo estas condiciones, las proteínas dañadas son dirigidas selectivamente al lisosoma después de interactuar con un complejo de varias proteínas, entre ellas una chaperona citosólica, Hsc70 (Cuervo & Wong, 2013). La interacción de la chaperona con la proteína blanco ocurre a través de un motivo específico de 5 aminoácidos (KFERQ), el cual está presente en todas las proteínas eliminadas por esta vía. La degradación se produce a continuación, tras la interacción de la proteína blanco con la proteína de membrana asociada al lisosoma tipo 2A (LAMP-2A). Esta unión promueve la multimerización de LAMP-2A para formar, junto con otras proteínas, un complejo de translocación. Después, la proteína blanco se despliega, cruza la membrana lisosomal a través del complejo de translocación formado por los múltiples segmentos transmembranales de LAMP-2A y ayudada por una chaperona que reside normalmente en el lumen del lisosoma, Hsc70 (lys-Hsc70), donde la proteína es finalmente degradada por enzimas hidrolíticas (Cuervo & Wong, 2013) (figura 1).

1.6. Microautofagia

Actualmente existe poca información acerca de los mecanismos y componentes moleculares que participan en la microautofagia. En este tipo de autofagia, los componentes citosólicos son directamente secuestrados por la membrana lisosomal, la cual se deforma para crear invaginaciones que engullen porciones de citoplasma que son degradadas al ser encerradas en su totalidad en el lumen del lisosoma (Cuervo *et al.*, 2005) (figura 1).

1.7. Macroautofagia

La macroautofagia es el tipo de autofagia más estudiado y es la vía de degradación de proteínas y componentes intracelulares a gran escala, incluyendo algunos organelos (Komatsu *et al.*, 2007). En respuesta a varios estímulos, tales como reducción de nutrientes, factores de crecimiento, hormonas, concentración de Ca^{2+} intracelular, niveles de ATP, hipoxia, acumulación de proteínas mal plegadas y muchos más (Wirawan *et al.*, 2012), una **membrana de aislamiento** (también conocida como **fagóforo**) se elonga gradualmente para secuestrar constituyentes citoplásmicos. Posteriormente, los extremos de esta membrana se fusionan para formar una estructura de doble membrana denominada **autofagosoma** (figura 2) (Xie & Klionsky, 2007). El autofagosoma se fusiona con los lisosomas (**autolisosoma**) y el contenido citoplásmico atrapado junto con la membrana interna del autofagosoma es degradado por una variedad de enzimas hidrolíticas (figura 2) (Xie & Klionsky, 2007).

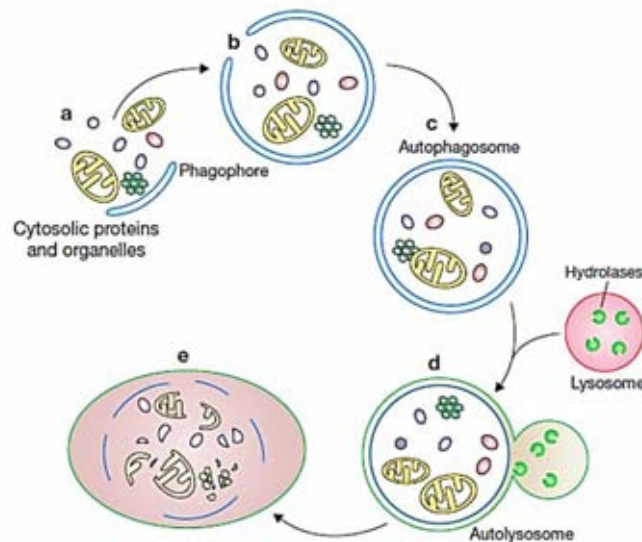


Figura 2. Representación esquemática del mecanismo de macroautofagia (Tomada de Xie & Klionsky, 2007).

1.8. Maquinaria Central de la Macroautofagia

La señalización molecular del mecanismo de macroautofagia explicado anteriormente aún está siendo descifrada, sin embargo, para su estudio se divide en cuatro etapas (Wirawan *et al.*, 2012) (figura 3):

1. **Inicio**, la inducción de la macroautofagia está controlada por el complejo de activación ULK, este complejo está formado por las proteínas ULK1, ATG13, ATG101 y FIP200. En condiciones basales (factores de crecimiento y nutrientes presentes) la enzima fosfatidilinositol 3 cinasa clase 1 (PI3KC1) mantiene activo a mTORC1, el cual bloquea la autofagia por unión y fosforilación de ULK1 y ATG13 dentro del complejo de activación ULK (figura

3). Pero, durante estrés celular y metabólico (por ejemplo, disminución de nutrientes) mTORC1 es inactivado, disociándose del complejo ULK y permitiendo la defosforilación en sitios represores y autofosforilarse ULK en sitios de activación que le permiten fosforilar a FIP200. ULK1 fosforila también a AMBRA1, la cual se encuentra unida al complejo PI3KC3 (llamado así porque contiene a la enzima fosfatidilinositol 3 cinasa clase 3 (PI3KC3), además de otras proteínas como BECN1) y a la dineína asociada al microtúbulo. Esta fosforilación libera a Ambra1 y al complejo PI3KC3 de los microtúbulos permitiendo su relocalización al retículo endoplásmico (figura 3), el cual es considerado uno de los principales organelos que contribuyen a la formación del autofagosoma.

2. **Nucleación**, una vez liberado el complejo PI3KC3 se une a la proteína ATG14L. La actividad enzimática de PI3KC3 genera fosfatidilinositol 3 fosfato (PI3P), el cual recluta más proteínas ATG al sitio de formación del autofagosoma (WIPI1, ATG2, DFCP1) (figura 3).

3. **Elongación**, en esta etapa son necesarios dos sistemas de conjugación tipo ubiquitina. Primero, ATG12 es activado por una enzima tipo E1, ATG7, después ATG12 es transferido a ATG10 (enzima tipo E2) y luego covalentemente ligado a ATG5. Este complejo ATG12-ATG5 interacciona con ATG16L1 para formar un trímero el cual consecuentemente homo-multimeriza para formar un complejo que se transloca al fagóforo para promover su elongación. Este complejo ATG12-ATG5-ATG16L1 actúa como una enzima ligasa E3 permitiendo la segunda reacción de conjugación. En esta segunda reacción de conjugación tipo ubiquitina, LC3-I (que se sintetiza como un precursor llamado LC3, el cual es constitutivamente cortado por la proteasa ATG4) se une covalentemente a fosfatidiletanolamina (PE) para formar LC3-PE (también llamado **LC3-II**) por la acción combinada de ATG7, ATG3 (enzima tipo E2) y el complejo ATG12-ATG5-ATG16L1 (ligasa E3) (figura 3). En contraste a LC3-I, LC3-II se localiza específicamente en la membrana de los autofagosomas y por lo tanto es comúnmente utilizado como marcador de autofagia. Una vez completada la formación del autofagosoma, ATG4 remueve a LC3-II de la membrana externa autofagosomal (proceso llamado desconjugación) reconstituyendo a LC3-I; la fracción de LC3-II que quedó asociado con la membrana interna del autofagosoma, se degrada por las hidrolasas lisosomales. La maduración de LC3 a LC3-I sucede inmediatamente posterior a la traducción de LC3, mientras que la lipidación de LC3-I para generar LC3-II ocurre solo en respuesta a una inducción de autofagia. La conjugación de ATG12 con ATG5 también ocurre de manera constitutiva. En cambio, su conjugación con ATG16L y translocación al sitio de elongación del fagóforo ocurre en respuesta a la inducción de autofagia.

4. **Maduración-degradación-reciclaje**, una vez formado el autofagosoma se dirige a los lisosomas, en donde la membrana externa del autofagosoma se fusiona con la membrana del lisosoma, liberando la membrana interna y su contenido dentro del lumen lisosomal. Varias proteínas están involucradas en

este evento de fusión incluyendo LAMP-2A, Rab, HOPS, SNAREs, entre otras (Wirawan *et al.*, 2012). Una vez dentro del lisosoma, el contenido es degradado por hidrolasas lisosomales y lipasas. Subsecuentemente, los aminoácidos, ácidos grasos y nucleósidos son liberados al citosol a través de permeasas para ser reciclados. Esto sucede cuando la inducción de la autofagia fue estimulada por la falta de nutrientes. Sin embargo, bajo otros inductores, el material digerido puede ser secretado, como por ejemplo la secreción de la proteína citosólica IL-1 β , una citocina proinflamatoria con funciones biológicas muy importantes en mamíferos (Piccioli & Rubartelli, 2013; Ponpuaket *et al.*, 2015). De esta manera la autofagia participa en diversas funciones.

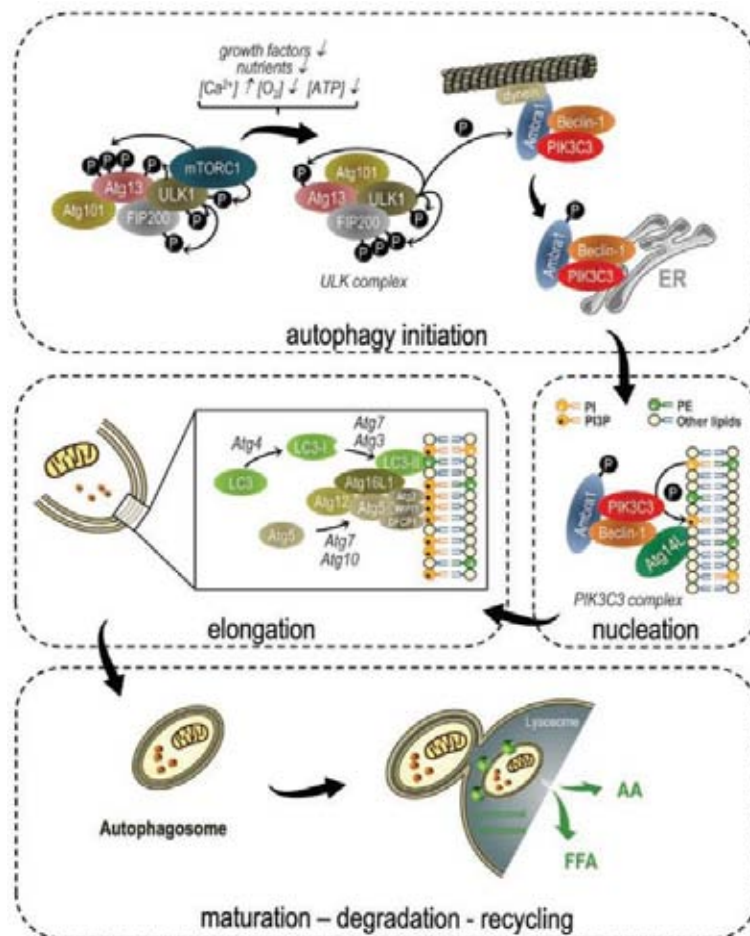


Figura 3. Maquinaria Central de la macroautofagia (tomada de Wirawan *et al.*, 2012).

1.9. Funciones de la Autofagia

Nuestro estudio se centra en la macroautofagia, por lo que de ahora en adelante me referiré a este como autofagia. Generalmente, una de las funciones primarias de la autofagia es la adaptación celular a la disminución de nutrientes. Si no hay alimento disponible, la célula se ve obligada a degradar parte de sus propias reservas para mantenerse con vida hasta que las condiciones mejoren (Mizushima *et al.*, 2008). Sin embargo, actualmente se han descrito una gran variedad de funciones adicionales para la autofagia, ya que interviene en la proliferación, crecimiento, diferenciación y muerte celular

(Wirawan *et al.*, 2012; Berry & Baehrecke *et al.*, 2008; Bouzas *et al.*, 2012). Además, funciona como una vía de defensa y eliminación de agentes infecciosos como bacterias y virus que entran al citosol ya sea directamente a través de la membrana plasmática o por internalización mediante vesículas (fagosomas) y como un mecanismo de control de calidad de organelos y proteínas disfuncionales (Van Limbergen *et al.*, 2009; Cuervo, 2004). Alteraciones en el flujo de la autofagia que llevan a la acumulación de autofagosomas (en algunos casos se debe a la disminución de la fusión de los autofagosomas con los lisosomas) contribuyen al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson y Huntington (Komatsu *et al.*, 2007), así como en la progresión del cáncer, en el proceso de envejecimiento y en la senescencia celular (Cuervo, 2004; Cuervo *et al.*, 2005; Mizushima *et al.*, 2008; Rubinsztein *et al.*, 2011; Young *et al.*, 2009).

La disminución del flujo de la autofagia en distintos tejidos está asociada con el envejecimiento, mientras que su estimulación puede tener potentes efectos anti-envejecimiento (revisado de Rubinsztein *et al.*, 2011). Cuando funciona correctamente, le llamamos *autofagia juvenil*. En este sentido, una de las consecuencias más inminentes de la insuficiencia autofágica está relacionada con la acumulación de “desperdicios” (estructuras dañadas) dentro de células postmitóticas de larga vida como neuronas y fibras del músculo esquelético (Cuervo *et al.*, 2005). Esta acumulación de desperdicios (agregados de proteínas dañinas y organelos dañados) resulta en un incremento de ROS, alto riesgo de mutaciones en el DNA y defectos en procesos biológicos, lo cual eventualmente afecta la funcionalidad autofágica/lisosomal y da lugar a un círculo vicioso pro-envejecimiento (Cuervo *et al.*, 2005). A esta autofagia disfuncional le llamamos *autofagia senil*.

1.10. Autofagia y Senescencia Celular

Recientemente se ha descrito que la autofagia está asociada al proceso de senescencia celular (Young & Narita, 2010). Por un lado, Kang y su grupo (2011) usando RNAs de interferencia (siRNA y shRNA) para silenciar a los genes *Atg7*, *Atg12* y *Lamp2* en fibroblastos diploides humanos (HDF), observaron que el silenciamiento de estos genes provocó la detención del ciclo celular, el incremento en la actividad β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -gal) y la acumulación de lipofuscina, todos estos considerados marcadores del estado senescente. Estos resultados sugieren que la inhibición de la autofagia induce senescencia en fibroblastos de humano (Kang *et al.*, 2011).

Por otro lado, Young y col. (2009) reportaron un incremento en la actividad autofágica en un modelo de senescencia inducido por el oncogén Ras (RIS, del inglés *Ras-induced senescence*). En comparación con células control no senescentes, observaron una acumulación de autofagosomas en células senescentes inducidas por Ras al analizar el patrón de localización celular de LC3-II. Observaron en células RIS un patrón punteado de EGFP-LC3 característico de la formación de autofagosomas, mientras que en células no senescentes se observó un patrón difuso con puntos ocasionales indicando la

actividad basal de autofagia. Además, usando una tinción que detecta pH bajo (lyso Tracker), marcaron los compartimentos lisosomales y encontraron que el patrón punteado de EGFP-LC3 colocaliza con los lisosomas, sugiriendo la formación de autolisosomas (Young *et al.*, 2009). Adicional a esto, y para evaluar la necesidad de la autofagia en senescencia, silenciaron a los genes *Atg5* y *Atg7* (genes esenciales para la formación de autofagosomas) usando RNAs de interferencia (shRNA). Encontraron que el silenciamiento de estos genes disminuyó el porcentaje de células positivas a la actividad SA- β -gal. Por lo tanto, con estos datos concluyeron que la senescencia inducida por Ras (RIS) requiere de una elevada actividad autofágica (Young *et al.*, 2009).

Resulta interesante encontrar una explicación a este aparente papel contradictorio de la autofagia en el establecimiento de la senescencia.

1.11. Senescencia Neuronal y Autofagia

Generalmente, toda la información sobre senescencia celular se ha obtenido a partir de experimentos en células mitóticas como por ejemplo en modelos de senescencia inducidos por oncogenes (OIS) (Young *et al.*, 2009; Narita *et al.*, 2011) o a partir de fibroblastos en cultivo (Kang *et al.*, 2011). Sin embargo, ¿Qué se sabe de senescencia en células post-mitóticas, particularmente en neuronas? Generalmente se había descartado la presencia de senescencia en células post-mitóticas, debido a que una de las características de las células senescentes es el bloqueo permanente de la proliferación (Rodier & Campisi, 2011). No obstante, recientemente se demostró por primera vez que neuronas corticales y neuronas de Purkinje de ratones viejos (32 meses de edad) presentan varios marcadores de senescencia como: actividad SA- β -gal, expresión de IL6, p38 fosforilada (p-p38), autofluorescencia (indicativo de acumulación de lipofuscina), γ H2AX, entre otros (Jurk *et al.*, 2012), concluyendo que las neuronas también expresan un fenotipo senescente, similar al que presentan células mitóticas. Además, este mismo grupo observó que la restricción de nutrientes en los ratones viejos redujo significativamente la frecuencia de neuronas de Purkinje positivas a los marcadores de senescencia (actividad SA- β -Gal, IL6, p-p38, autofluorescencia, γ H2AX) (Jurk *et al.*, 2012). En este sentido, es bien conocido que la restricción calórica induce autofagia en muchos órganos y tejidos (Mizushima *et al.*, 2004; Martinet *et al.*, 2006), incluyendo el cerebro (Alirezai *et al.*, 2010).

Así mismo, se ha reportado que la eficiencia de la autofagia en cerebro de ratón disminuye con la edad, provocando un incremento en agregados de proteínas poliubiquitinadas en hipocampo, lo cual a su vez está asociado con déficit cognitivo. No obstante, el tratamiento con restricción calórica es capaz de aminorar el déficit cognitivo asociado con la activación de autofagia (Yang *et al.*, 2014). En conjunto, estos datos sugieren que la disfunción de la autofagia asociada al envejecimiento (*autofagia senil*) está relacionada con el fenotipo senescente observado en neuronas de ratones viejos (Jurk *et al.*, 2012) y que la restricción calórica permite su restitución funcional (activando la *autofagia juvenil*), haciéndola responsable de la disminución de los marcadores de senescencia en las neuronas de Purkinje de los ratones viejos. Sin embargo, actualmente no hay reportes que demuestren esta hipótesis.

Golde y Miller en su hipótesis conocida como “proteinopatía” y mencionada anteriormente, proponen que la acumulación de proteínas amiloides en enfermedades neurodegenerativas desencadena una respuesta inmune innata, la cual conduce a senescencia que a su vez generará más moléculas pro-inflamatorias y pro-senescentes (SASP) que podrían funcionar auto y parácrinamente (Golde y Miller, 2009). Con base en lo mencionado anteriormente, en este trabajo proponemos que la senescencia neuronal fisiológica (no necesariamente la formación de precipitados proteicos que se observan en la neurodegeneración) iniciaría el estado de inflamación (mediado por SASP) que se observa en cerebros viejos y que a su vez, esta inflamación reforzaría y propagaría la senescencia celular, lo cual conllevaría al deterioro de las funciones cognitivas.

Hasta el momento aún no es totalmente aceptada la senescencia en neuronas, pues solo se ha publicado el trabajo descrito anteriormente, y se desconoce si las neuronas senescentes también secretan el SASP. Menos aún se conoce si se altera la autofagia durante la senescencia neuronal y si participa en el establecimiento de dicho fenómeno. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo se enfocó en desarrollar un modelo de senescencia neuronal *in vitro* que reproduzca las características descritas *in vivo* en neuronas de cerebros viejos y que permita observar y manipular la autofagia para estudiar su papel en este proceso celular.

Este trabajo es importante porque permitirá estudiar las bases moleculares de la senescencia neuronal y los cambios que ocurren en la autofagia para convertirla de *juvenil* a *senil*. Con este entendimiento podríamos evitar la secreción de citocinas inflamatorias al inhibir la *autofagia senil* o bien inducir la *autofagia juvenil*, con la expectativa de revertir el fenotipo senescente y detener el deterioro cerebral.

2. Hipótesis

La senescencia neuronal fisiológica se reproduce *in vitro*. Si es causada por alteraciones en la autofagia que caracterizan a la *autofagia senil*, al inhibir la *autofagia juvenil* (antes de que se establezca la senescencia) se aumentará el número de neuronas senescentes.

3. Objetivo General

- Establecer un modelo de senescencia neuronal *in vitro* que reproduzca la senescencia neuronal fisiológica, para estudiar el papel de la autofagia en el establecimiento del fenotipo senescente.

4. Objetivos Particulares

1. Establecer un modelo de senescencia neuronal en cultivos de células corticales neonatales de rata.

Metas específicas:

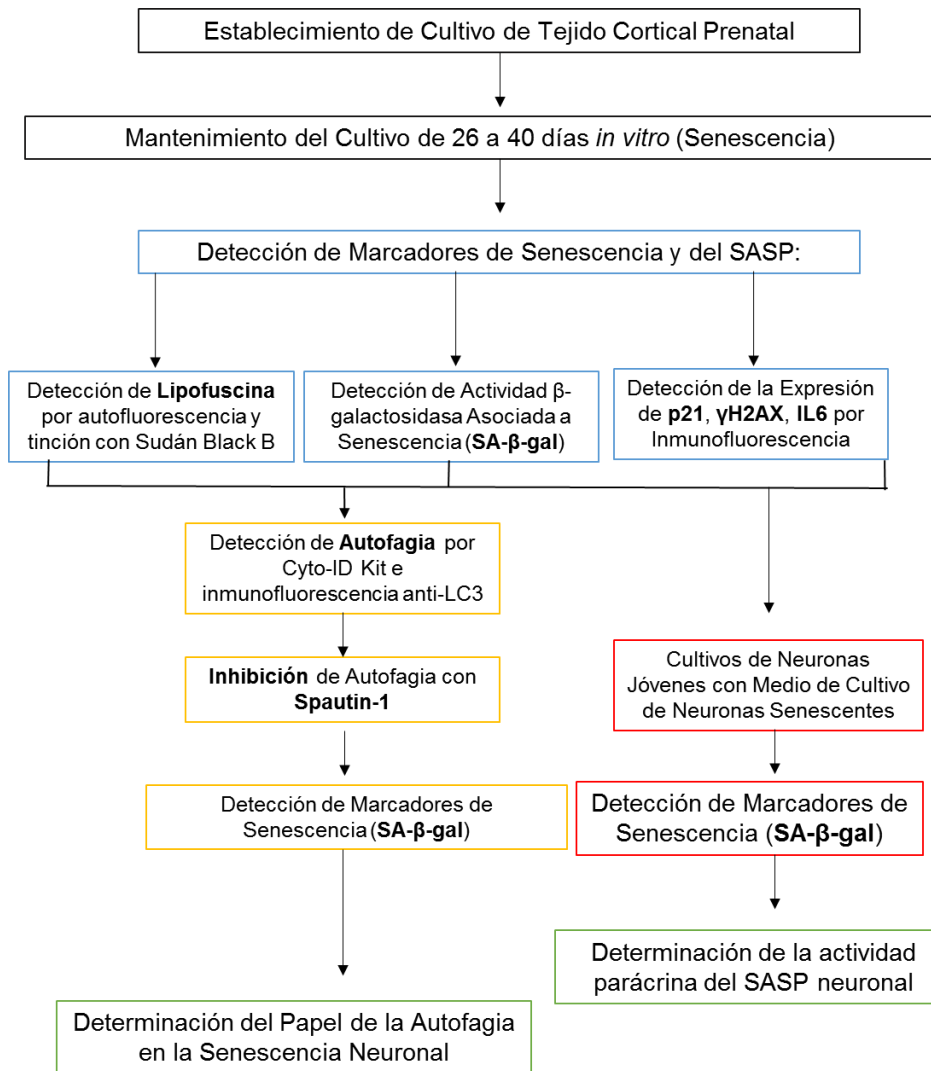
- i. Detectar la actividad β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -gal).
- ii. Comprobar la acumulación de lipofuscina.
- iii. Determinar la respuesta de daño al DNA detectando γ H2AX y la expresión del supresor tumoral p21.
- iv. Comprobar la secreción del SASP al detectar a IL6 y el aumento en especies reactivas de oxígeno.
- v. Determinar si las células corticales senescentes tienen un efecto parácrino, estudiando el efecto de medios condicionados de células senescentes sobre cultivos jóvenes.

2. Determinar la contribución de la autofagia en el establecimiento de la senescencia cortical.

Metas específicas:

- i. Inhibir la autofagia con el agente farmacológico Spautin-1, que promueve la degradación del complejo PI3KC3 (Liu *et al.*, 2011) y observar si se altera el número de células senescentes.

5. Estrategia Experimental



6. Material y Métodos

6.1 Cultivo de tejido cortical de rata Wistar

Se extrajeron fetos de ratas Wistar de 17 días de gestación, se aisló la corteza cerebral y se disoció con tripsina-EDTA 10%, se disgregó el tejido pipeteando varias veces con una pipeta Pasteur y las células se siembran en cajas de 12 pozos sobre cubreobjetos para realizar inmunofluorescencia y en cajas Petri de 10 cm para Western blot. Las cajas de cultivo se cubrieron con poly-L-lisina (PLL) 1X 24 h antes de la siembra. Las células se sembraron con medio Neurobasal (Life Technologies) suplementado con B27 (Life Technologies), 300 μM de L-glutamina (Sigma-Aldrich), 25 μM de β-mercaptoetanol y Gentamicina (0.02 mg/ml). Cada 6 días se cambió la mitad de medio por medio nuevo. Los cultivos se mantuvieron en estas condiciones por 40 días *in vitro*

(40 DIV). Los experimentos se realizaron a los 6 días *in vitro* DIV (cultivo joven), así como 26 DIV y 40 DIV (cultivo senescente).

Ver Anexo 1 para conocer el protocolo completo.

6.2. *Conteo celular y edición de imágenes*

Se usó el microscopio invertido Nikon ECLIPSE Ti-U junto con el programa de análisis de imágenes NIS Elements, Basic Research, Version 3.13 para conteo celular y edición de imágenes.

6.3. *Actividad SA- β -gal*

La actividad β -galactosidasa se analizó siguiendo el protocolo de Dimri y colaboradores (1995). Las células se fijaron con 2% de formaldehído + 0.2 % de glutaraldehído durante 5 min, se lavaron con PBS y se tiñeron con la solución de tinción que contenía: 20 mg/ml de X-gal (IBI SCIENTIFIC, IB02260) en dimetilformamida, buffer de ácido cítrico/fosfato de sodio 0.2M (a pH=6 importante), ferrocianuro de potasio 100 mM, ferricianuro de potasio 100 mM, cloruro de sodio 5M y cloruro de magnesio 1M. Las células se incubaron por 16 h a 37 °C (Dimri *et al.*, 1995; Debacq-Chainiaux *et al.*, 2009) y se observaron en el microscopio invertido Nikon ECLIPSE Ti-U, se contó el número de células positivas a SA- β -gal de un total de 500 células. Ver Anexo 2 para conocer el protocolo completo.

6.4. *Detección de lipofuscina*

Se detectó la acumulación de lipofuscina por autofluorescencia usando el microscopio invertido Nikon ECLIPSE Ti-U, así mismo se usó la tinción con Sudan Black B el cuál es capaz de detectar lipofuscina (Georgakopoulou *et al.*, 2013).

6.5. *Tinción con Sudan Black B (SBB)*

Preparación de la solución SBB: Se disolvieron 0.07 g de Sudan Black B (Sigma-Aldrich #199664) en 10 ml de etanol al 70%, se cubrió el recipiente con Parafilm y se agitó con mosca toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente se filtró en papel filtro Whatman y se almacenó a temperatura ambiente. NOTA: Se debe evitar la evaporación de la solución en todos los pasos.

Procedimiento de tinción: Las células se sembraron en cubreobjetos se lavaron con PBS 1X y se fijaron con paraformaldehído 4% por 30 min. Después se lavaron 3 veces con PBS 1X y se incubaron con etanol 70 % por 2 min. Posteriormente se dejó caer sobre el portaobjetos una gota de la solución de SBB recién preparada, y se colocó el cubreobjetos boca abajo sobre la gota de la solución SBB y se incubó por 10 s para evitar la posible precipitación. Se levantó el cubreobjetos y se limpiaron los bordes con un papel suave, después se lavó el cubreobjetos en etanol al 50% por 1 min para remover suciedad y luego se lavó en agua destilada 1 min. Se eliminó el agua y se dejó en PBS 1X para su examinación o se montó con una gota de medio de montaje (VectaShield, Vector Laboratories #H-1000) sellando las orillas con barniz de uñas transparente y se guardaron a 4 °C.

6.6. *Detección de radical superóxido*

Los radicales superóxido fueron detectados con hidroetidina (Cat. No. D1168, Molecular Probes) (excitación: 518 nm y emisión: 605 nm). Se retiró la mitad de medio de cada pozo (500 ml), se colocaron en un tubo falcón y se agregó el volumen necesario de hidroetidina para que cada pozo (1 ml) quede a una concentración final de hidroetidina de 2.3µM, se agitó por inversión y se regresaron los 500 ml a cada pozo. Se incubó 30 min a 37 °C, 5% de CO₂ y se tomaron fotos en microscopio de epifluorescencia Nikon ECLIPSE Ti-U usando el filtro rojo.

6.7. *Inmunofluorescencia*

Las células se fijaron con paraformaldehído 4 %, se permeabilizaron con PBS/Tritón 0.5 % por 5 min, se bloquearon con PBS/suero de cabra 4 %/ BSA 4% y se incubaron toda la noche (14-16 horas) a 4 °C con el anticuerpo primario. Después se incubaron 30 min a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario acoplado al fluoróforo que se necesite, diluido en PBS/BSA 2%. Después se incubaron por 2 min con DAPI 1 µg/ml, se lavaron con PBS y se montaron los cubreobjetos con una gota de medio de montaje (VectaShield, Vector Laboratories #H-1000) sellando las orillas con barniz de uñas transparente y se guardaron a 4 °C protegidos de la luz. Para lista completa de anticuerpos primarios y secundarios y para conocer el protocolo completo ver Anexo 3.

6.8. *Detección autofagosomas con Cyto ID kit (ENZ-51031:K200)*

Este protocolo se realizó a partir de células sembradas en cajas de 35 mm. Primero se preparó el reactivo de detección con 1.5µl de la solución de Cyto ID y 1.5µl de Hoechst en 1.5 ml de medio neurobasal previamente calentado. Luego, se removió todo el medio de la caja de 35 mm y se agregó el reactivo de detección previamente preparado, se incubó 30 min a 37 °C, 5% de CO₂. Una vez terminada la incubación se eliminó el reactivo de detección, se lavó una vez con 1.5 ml de medio neurobasal, se agregó 1.5 ml de medio neurobasal nuevo y se observó al microscopio de epifluorescencia Nikon ECLIPSE Ti-U lo más rápido posible, usando el filtro verde.

6.9. *Obtención de medio condicionado*

Para el cultivo de tejido cortical con medio de cultivo senescente, se realizaron 3 diluciones: 1) 500µl medio senescente más 500µl medio nuevo (relación 1:1), 2) 750µl medio senescente más 250µl medio nuevo (relación 3:1) y 3) 1 ml de medio senescente.

Se extrajo el tejido cortical de fetos de rata Wistar se sembraron las células en cajas de 12 pozos con medio nuevo (0 DIV) y al día siguiente se agregaron las distintas diluciones a sus respectivos pozos (3 pozos por tratamiento) y se mantuvieron por 6 días *in vitro* (6 DIV) para después detectar actividad SA-β-gal a los 6 DIV.

6.10. Tratamiento de células corticales con Spautin-1

La administración de Spautin-1 se llevó a cabo en células sembradas en cajas de 12 pozos. Primero se preparó la solución de Spautin-1 en medio neurobasal para que cada pozo (con 1 ml de medio) quedará a una concentración final de Spautin-1 de 2 μ M en 1 ml de medio neurobasal. Se removieron 500 μ l de medio de cada pozo y se agregaron 500 μ l de la solución de Spautin-1 previamente preparada y las células se regresaron a la incubadora. La administración de Spautin-1 se realizó a los 6, 13, 19 y 25 DIV. El medio fue cambiado normalmente cada 6 días sin renovar la dosis de Spautin-1. A los 26 DIV se detectó la actividad SA- β -gal para determinar el efecto de Spautin-1.

6.11. Western blot

Las células se homogenizaron en un buffer de lisis que contiene (Tris 25 mM, NaCl 50 mM, Igepal 2%, SDS 0.2% y 2 mg/ml de inhibidores de proteasas 18 (Complete, Roche), pH 7.4). Se utilizaron treinta microgramos de muestra para los ensayos de electroforesis en geles de acrilamida en condiciones desnaturizantes. Los geles fueron transferidos utilizando membranas de PVDF. Las membranas se bloquearon con TTBS (Trizma 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, Tween 0.1 %) en leche Carnation 5% durante 1 hora. Se incubaron durante toda la noche con el anticuerpo primario a 4°C, anti-p62 (1:500) y anti-BECN1 (1:2000) (ver tabla de anticuerpos en Anexo 3). Se realizaron 3 lavados con TTBS de 10 minutos cada uno y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo en TTBS 5 % leche carnation. Las membranas se revelaron con un sistema de quimioluminiscencia (Millipore) y fueron expuestas en placas Kodak.

7. Resultados

7.1. Establecimiento del modelo de senescencia neuronal en cultivos de células corticales prenatales de rata.

7.1.1. El cultivo cortical permanece viable hasta 40 DIV con proliferación constante de glía.

En los primeros experimentos se determinó la viabilidad y se evaluó la aparición de células con actividad de SA- β -gal a lo largo de 60 días *in vitro* (DIV). Observamos abundante número de células positivas a SA- β -gal a partir de los 26 DIV, y que la viabilidad baja drásticamente después de los 40 DIV, por lo que en los experimentos posteriores analizamos el fenotipo de las células corticales comparando a los 6, 26 y 40 DIV.

Primeramente se analizó el porcentaje de glía y de neuronas en el tejido cortical cultivado a los diferentes tiempos (6, 26 y 40 DIV). Mediante inmunofluorescencia se detectó la expresión de **β -III-tubulina** (TUJ-1), la cual es uno de los componentes de los microtúbulos del citoesqueleto específico de neuronas, así como la presencia de la proteína gliofibrilar ácida (**GFAP**), la cual

forma parte de los filamentos intermedios del citoesqueleto de las células gliales. En la figura 4 se observa que al inicio del cultivo hay un 95% de neuronas, a los 26 DIV se observa una cantidad de glía similar al de neuronas y para los 40 DIV alrededor del 70% de las células observadas son células gliales. Cabe señalar que entre las modificaciones que se hicieron al cultivo para lograr que sobrevivieran hasta 40 DIV, encontramos que la adición de Arabinosa C, que normalmente se usa para inhibir la proliferación de las células gliales, limita la viabilidad. En todos los cultivos subsecuentes se permitió la proliferación de células gliales, lo cual resultó útil para reproducir una situación más semejante a lo que ocurre *in vivo*, ya que las neuronas se mantienen en comunicación con células gliales.

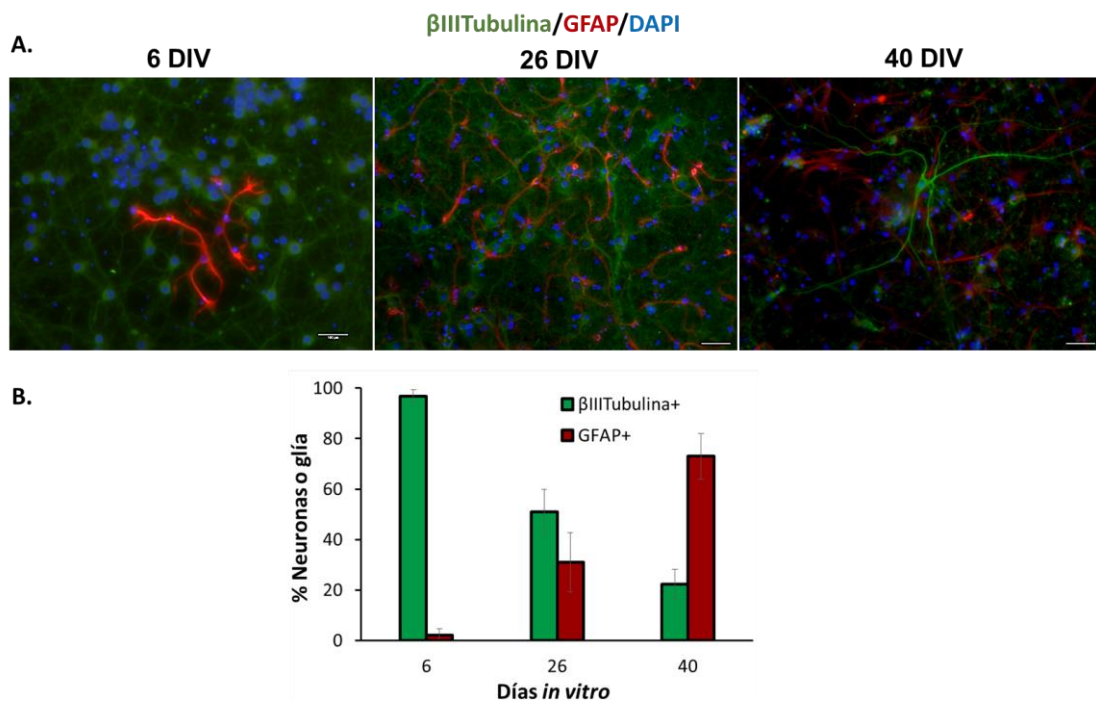


Figura 4. El número de células gliales aumenta a medida que avanza el tiempo del cultivo cortical, ya que no se inactivan mitóticamente. A, Inmunofluorescencia para la detección de neuronas usando el marcador β -III-tubulina y de células gliales usando GFAP en cultivo primario de tejido cortical a los tiempos indicados (6, 26 y 40 DIV). La barra representa 100 μ m. B, Porcentaje de neuronas o de células gliales a los distintos tiempos de cultivo (6, 26 y 40 DIV) medido por inmunofluorescencia contra β -III-tubulina y contra GFAP. Los datos representan la media y la barra la desviación estándar (n=3). Cada n fue hecha por triplicado.

7.1.2. El cultivo primario cortical adquiere actividad SA- β -gal y acumula lipofuscina.

La detección de la **actividad SA- β -gal** es un marcador ampliamente usado para detectar el fenotipo senescente. Por lo tanto, se analizó dicho marcador en el cultivo de tejido cortical a lo largo del tiempo. A medida que avanzaron los días *in vitro* (DIV) del cultivo, se incrementó el número de células positivas a actividad SA- β -gal (células azules) hasta llegar a 87 % a los 40 DIV (Figura 5A y 5C), lo que sugiere la adquisición de un fenotipo senescente.

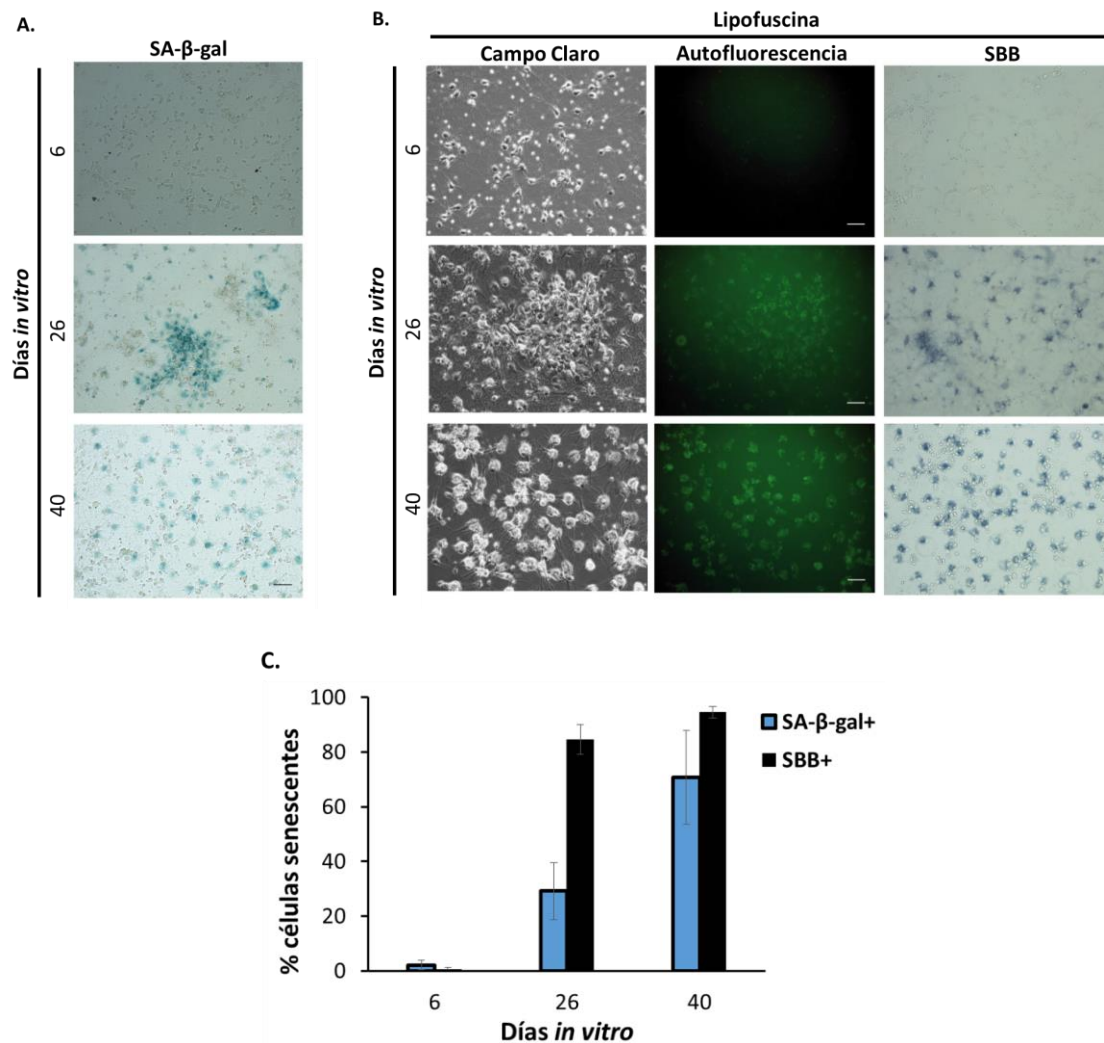


Figura 5. El número de células positivas a actividad SA-β-gal y la acumulación de lipofuscina aumentaron a lo largo del tiempo del cultivo. A, Imágenes representativas en campo claro de la tinción SA-β-gal (azul) en cultivo primario de tejido cortical de rata a 6, 26, 40 y 60 DIV. B, Detección de lipofuscina por autofluorescencia o por tinción con el colorante Sudan Black B (SBB) en cultivos de células corticales mantenidos 6, 26 o 40 días *in vitro*, como se indica. La barra representa 100 μm. C, Porcentaje de células corticales positivas a actividad SA-β-gal o SBB a los días indicados de cultivo. Los datos representan la media y la barra la desviación estándar (n=3). Cada n fue hecha por triplicado.

Para confirmar la presencia de un fenotipo senescente en el cultivo cortical se determinó la **acumulación de lipofuscina**, que es un agregado de proteínas, lípidos, oligosacáridos y otros componentes, que se almacena en grandes cantidades durante el envejecimiento y en estadios finales de senescencia (Terman & Brunk, 2004). Una de las características de la lipofuscina es la autofluorescencia, la cual fue evaluada a lo largo del tiempo en el cultivo cortical observando un incremento en la intensidad de autofluorescencia a los 26 DIV y con una intensidad mayor a los 40 DIV (Figura 5B).

Otra manera de detectar y confirmar la presencia de lipofuscina es mediante la tinción con Sudan Black B (SBB), la cual es una tinción histoquímica lipofílica que identifica lipofuscina tanto *in vitro* como *in situ*, y además es usado como marcador de células senescentes (Georgakopoulou *et al.*, 2013). El cultivo de

tejido cortical es positivo a la tinción con SBB a los 26 y 40 DIV, mientras que células jóvenes de 6 DIV son negativas a SBB (Figura 5B y 5C), confirmando lo observado con la autofluorescencia del cultivo.

7.1.3. Las neuronas y no la glía, muestran focos de daño al DNA cuando senescen.

El **daño al DNA** es uno de los tipos de estrés que es capaz de inducir senescencia celular y además es uno de los más estudiados, y por consiguiente es considerado un marcador de senescencia. Por lo tanto, se analizó la respuesta de daño al DNA al detectar por inmunofluorescencia a la Histona fosforilada γ H2AX (que se localiza en los sitios de daño al DNA), junto con β -III-tubulina o GFAP para determinar específicamente el tipo celular que estuviera respondiendo al daño al DNA. Observamos que a los 26 DIV se aumenta el número de células positivas a γ H2AX (Figura 6A y 6B). Además, las neuronas fueron las que mayoritariamente activaron la respuesta al daño al DNA (Figura 6A y 6C). Inesperadamente, a los 40 DIV se observaron muy pocas células positivas a γ H2AX y las pocas positivas esta vez si corresponden a células gliales (Figura 6A y 6C). Esta reducción del número de células con γ H2AX puede deberse a que las neuronas repararon el DNA dañado o a que murieron, como se discute más adelante. Resultó inesperado que las células gliales no tuvieran respuesta al daño al DNA a los 40 DIV, pues sí presentan otras características de senescencia como la activación de SA- β -gal y la acumulación de lipofuscina.

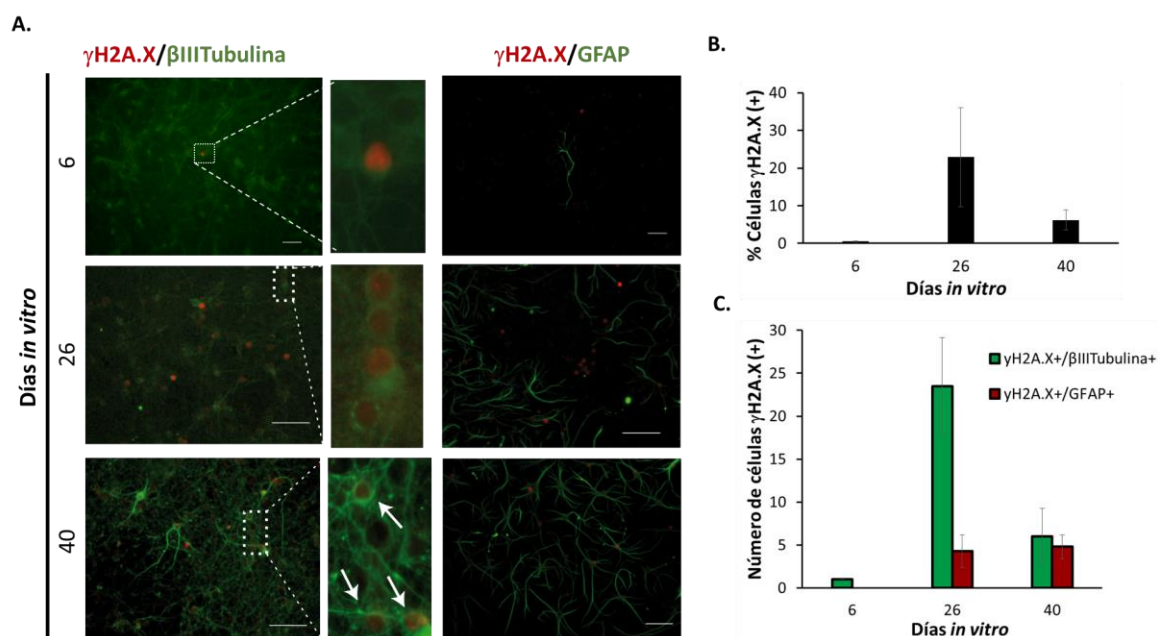


Figura 6. Las neuronas, y no la glía, muestran focos de respuesta al daño al DNA a los 26 DIV. A, Inmunofluorescencia para detectar la expresión de γ H2AX en cultivo primario de tejido cortical a los tiempos indicados. Las neuronas se marcaron detectando la expresión de β -III-tubulina y la glía con la expresión de GFAP. La barra representa 100 μ m. Los recuadros muestran la zona ampliada a la derecha. B, Se grafica el porcentaje de células que expresan γ H2AX respecto al total de células en cultivo. C, Se grafica el número total de neuronas o glía con respuesta al daño al DNA respecto a un total de 150 células en promedio. Nótese que la fosforilación de γ H2AX ocurre mayoritariamente en neuronas a los 26 días. Los datos representan la media y la barra la desviación estándar (n=3). Cada n fue hecha por triplicado.

7.1.4. La expresión del supresor tumoral p21 incrementa en neuronas corticales senescentes.

En respuesta al daño del DNA se induce la transcripción de la proteína p21 vía p53, con la finalidad de detener el ciclo celular (característica de senescencia). Por lo tanto, la expresión de p21 es usada comúnmente como marcador de senescencia en células mitóticas. Ya que durante la senescencia neuronal en cultivo observamos respuesta al daño del DNA (Figura 6) probablemente también encontremos expresión de la proteína p21, además de que se expresa en cerebro de ratones de 32 meses (Jurk *et al.*, 2012). Efectivamente, por inmunofluorescencia observamos un incremento en la expresión de p21 exclusivamente en neuronas a los 26 DIV (Figura 7), acorde a la detección de γ H2AX en neuronas a ese tiempo (Figura 6). Hasta los 40 DIV se observaron células gliales positivas a p21 (Figura 7A y 7C), lo que sugiere que la expresión de p21 en glía podría ser por una vía diferente a p53 en respuesta al daño al DNA. En conjunto, estos resultados sugieren que las neuronas, y no la glía, adquieren primero el fenotipo senescente.

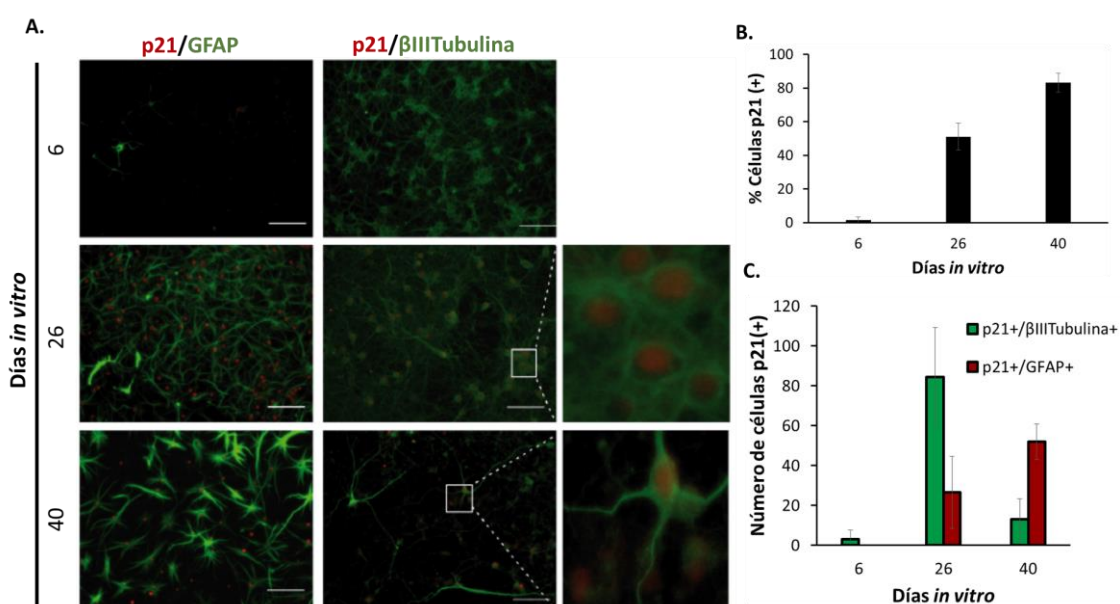


Figura 7. La expresión de p21 aumenta en neuronas de 26 DIV y en glía hasta los 40 DIV. A, Inmunofluorescencia para detectar la expresión de p21 en cultivo primario de tejido cortical a los tiempos indicados. Las neuronas se marcaron detectando la expresión de β -III-tubulina y la glía con la expresión de GFAP. La barra representa 100 μ m. Los recuadros indican la zona ampliada que se muestra a la derecha. B, Se grafica el porcentaje de células que expresan p21 respecto al total de células en cultivo. C, Se grafica el número total de neuronas o glía que expresan p21. Los datos representan la media y la barra la desviación estándar (n=3). Cada n fue hecha por triplicado.

7.1.5. La expresión de IL6 incrementa en neuronas corticales senescentes antes que en la glía.

Otra de las características de las células senescentes y una de las más distintivas, es la expresión de un fenotipo de secreción asociado a senescencia

(SASP en inglés), en el cual secretan una gran cantidad de factores y proteínas, siendo la interleucina 6 (IL6) una de las más comunes. Por ello, se analizó mediante inmunofluorescencia la expresión de IL6 en el cultivo cortical (Figura 8A) y observamos un incremento en la señal de IL6 a los 26 y 40 DIV comparado con células jóvenes de 6 DIV (Figura 8A y 8B). Al igual que para p21 y para γ H2AX, la expresión de IL6 colocalizó con neuronas a los 26 pero no con glía (Figura 8A), sugiriendo que las neuronas son las responsables del fenotipo secretor que altera el microambiente del cultivo.

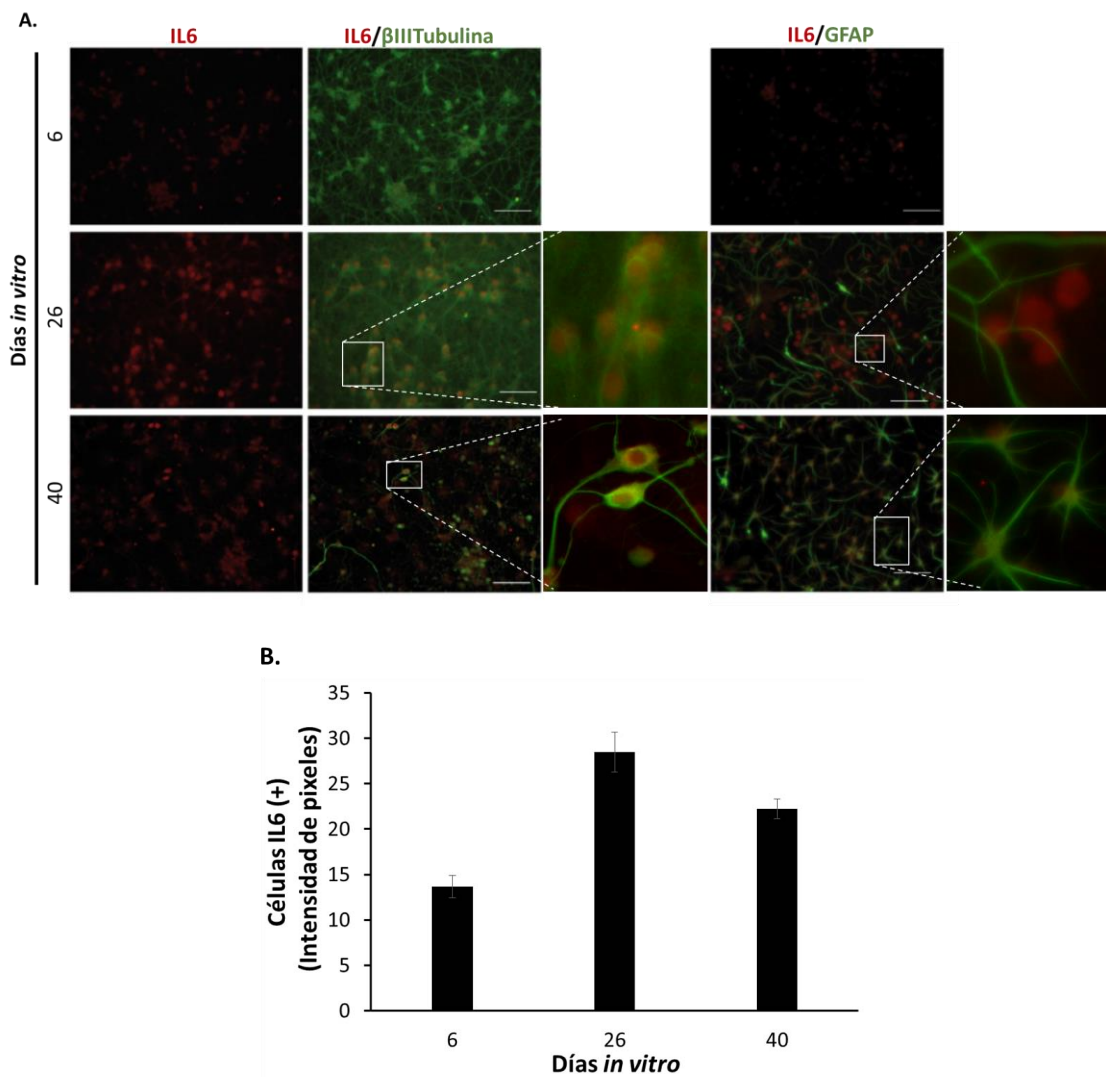


Figura 8. La expresión de IL6 aumenta solo en neuronas de 26 y en glía hasta los 40 DIV. A, Inmunofluorescencia para detectar la expresión de IL6 en cultivo primario de tejido cortical a distintos tiempos (6, 26 y 40 DIV). Las neuronas se marcaron detectando la expresión de β -III-tubulina y la glía con la expresión de GFAP. La barra representa 100 μ m. Los recuadros muestran la zona ampliada a la derecha. B, Promedio de la intensidad de pixeles de la señal de IL6 en neuronas y células gliales a los tiempos indicados. La barra indica la desviación estándar (n=3).

7.1.6. Producción de superóxido incrementa en células corticales de 26 DIV

Durante la senescencia celular aumenta la cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS), que también son secretadas en el SASP. Detectamos la producción de superóxido utilizando el reportero fluorescente hidroetidina (HE) (Hernández *et al.*, 2010). Los resultados muestran un incremento de superóxido a los 26 DIV (núcleos rojos) de cultivo en comparación con las células jóvenes de 6 DIV (Figura 9). En este caso no se distinguió el tipo celular, pero podrían ser neuronas, ya que la señal disminuye a los 40 DIV.

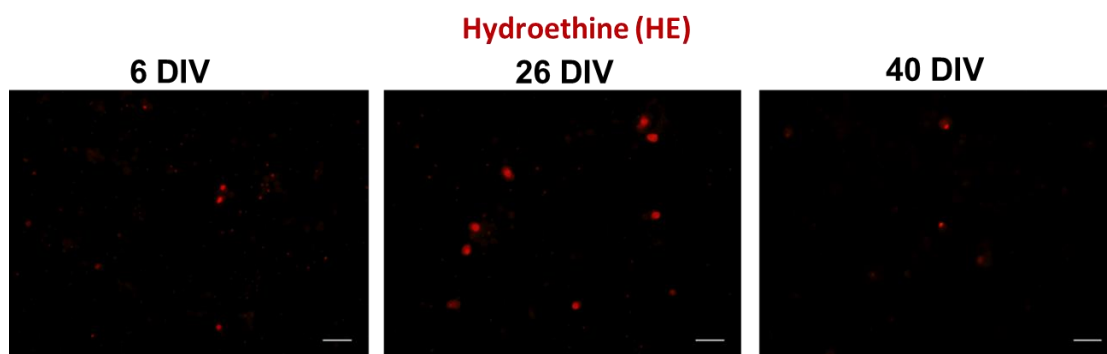


Figura 9. Incremento en la producción de superóxido en células corticales de 26 DIV. Células positivas a hidroetidina (fluorescencia en rojo) muestran producción de radical superóxido a los 26 DIV del cultivo cortical. Barra representa 100 μm (n=1).

En resumen, todos estos resultados nos indican que las neuronas corticales, y no la glía, senescen en cultivo a los 26 DIV con las mismas características que las descritas *in vivo*. Si bien a los 26 DIV la mitad de la población es glía, no es sino hasta los 40 DIV que presentan todas las características de senescencia. Por lo tanto, el cultivo de tejido cortical que establecimos puede funcionar como un modelo de senescencia de neuronas, de glía y de la influencia de un tipo celular sobre el otro.

7.2. Las células corticales inducen senescencia de manera parácrina.

Una de las características de las células senescentes es la capacidad de inducir senescencia a células vecinas no senescentes, a través de su fenotipo secretor (SASP) (Kuilman & Peeper, 2009). Para demostrar que las neuronas senescentes *in vitro* no solo expresan IL6 y generan ROS, sino que también secretan componentes capaces de inducir senescencia en neuronas jóvenes, se cosecharon medios condicionados y se evaluó su efecto sobre la inducción de senescencia en células corticales recién aisladas. Se realizó un experimento (ver diagrama en figura 10A) cultivando tejido cortical de 1 DIV con distintas diluciones de medio condicionado de tejido cortical de 6, 26 o 40 DIV y se mantuvo dicho cultivo por 6 días, tiempo al que se realizó la tinción para detectar actividad SA- β -gal con la finalidad de identificar células senescentes. Como se muestra en la figura 10B, hubo un incremento en el número de células positivas a SA- β -gal en el cultivo de 6 DIV tanto con el medio

condicionado de cultivos senescentes de 26 DIV, como de 40 DIV (Figura 10B). Esto indica que tanto las neuronas (26 DIV) como la glía (40 DIV) senescentes tienen un efecto parácrino mediado por el SASP sobre neuronas jóvenes.

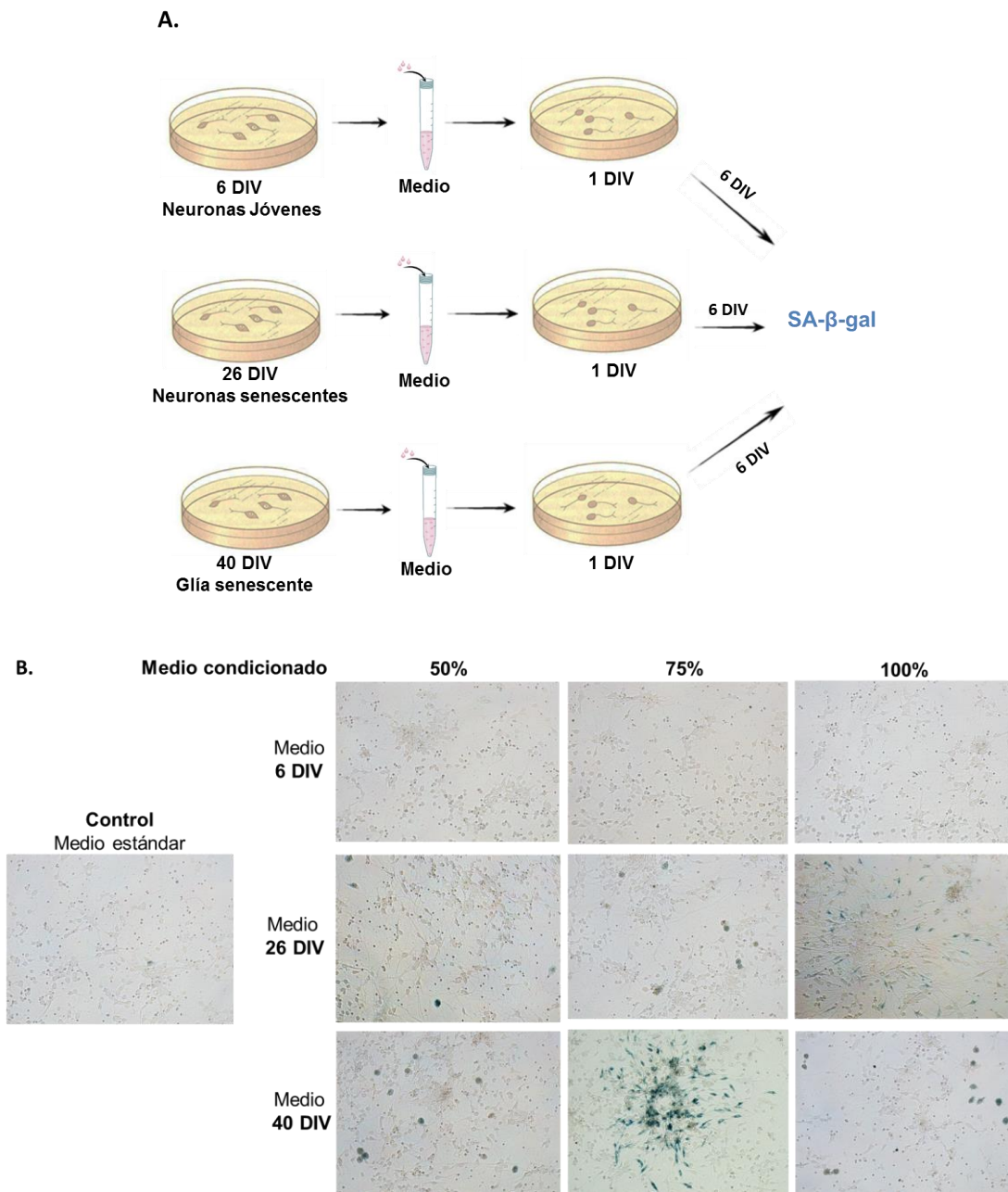


Figura 10. Tanto las neuronas como la glía senescentes tienen un efecto parácrino, mediado por el SASP, sobre neuronas jóvenes. A, Esquema que explica el diseño del experimento, incluyendo los controles. B, Imágenes en campo claro representativas de la tinción SA-β-gal (azul) en tejido cortical de 6 DIV, que fue cultivado desde el primer día (1 DIV) con las diluciones indicadas de medio condicionado tomado a los DIV indicados: 50% (500μl medio senescente + 500μl medio nuevo); 75% (750μl medio senescente + 250μl medio nuevo); 100% de medio senescente (n=3).

7.3. El flujo de la autofagia se interrumpe en la senescencia cortical.

Con el objetivo de determinar la participación de la autofagia en el establecimiento de la senescencia neuronal, se detectó la presencia de autofagosomas en las células corticales a los distintos tiempos de cultivo (6, 26 y 40 DIV) usando el reactivo CYTO ID®, que fluoresce específicamente en autofagosomas (no detecta lisosomas porque pierde la fluorescencia en ambientes ácidos) dentro de la célula. Los resultados muestran un incremento en el patrón punteado que fluoresce en verde, característico de autofagosomas, a los 26 y 40 DIV en comparación con los 6 DIV (Figura 11A).

Para confirmar la acumulación de autofagosomas, también se realizó una inmunofluorescencia contra la proteína LC3, la cual se localiza difusa en el citoplasma, a menos que se induzca la autofagia, pues entonces se lipida y transloca a los autofagosomas, por lo que se detecta como puntos dentro de la célula. Observamos un aumento en la señal punteada de LC3 (fluorescencia verde) en el citoplasma en las células corticales de 26 y 40 DIV (Figura 11B). Ambos resultados indican que aumenta el número de autofagosomas durante la senescencia de células corticales. Esto se puede deber a un aumento en la activación de la autofagia, o a una inhibición del flujo autofágico. Es decir, si se bloquea la fusión de los autofagosomas con los lisosomas como se ha observado en la neurodegeneración, también se verá un aumento de autofagosomas.

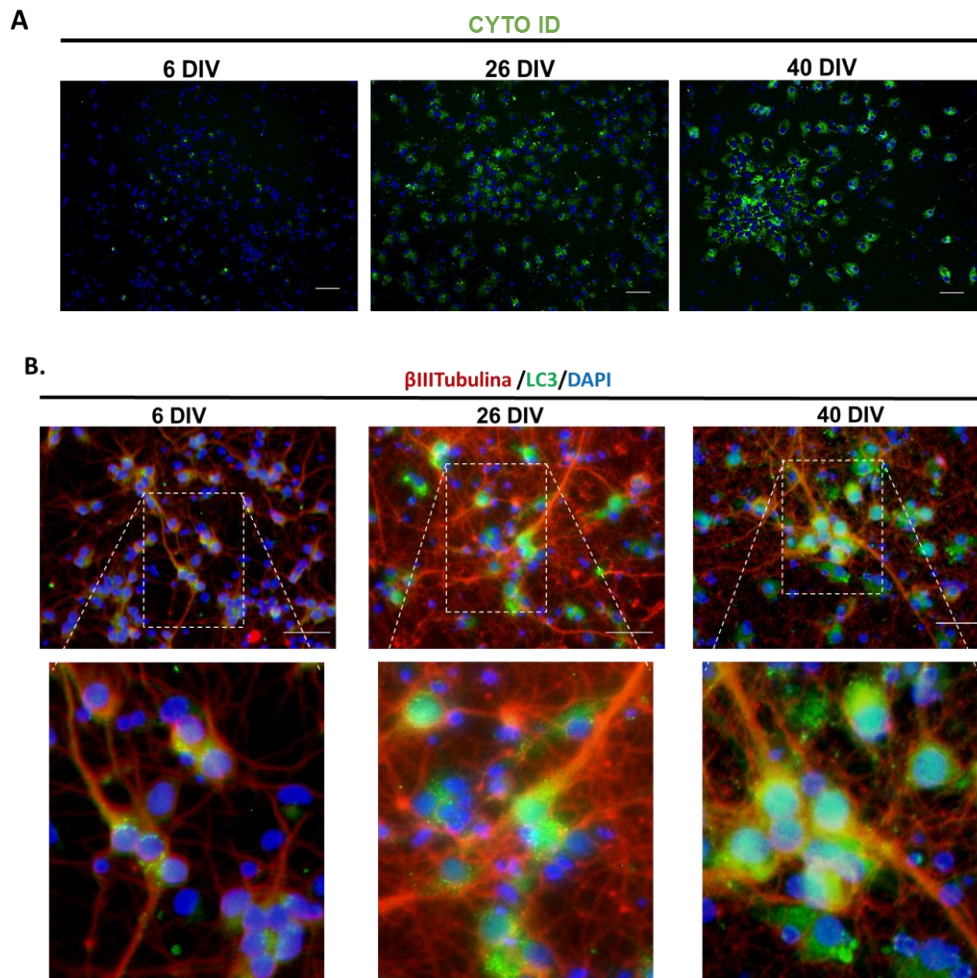


Figura 11. Se acumulan autofagosomas en células corticales senescentes. A, Tinción de CYTO ID® (fluorescencia verde) en cultivo primario de tejido cortical a distintos tiempos (6, 26 y 40 DIV). Los núcleos fueron marcados con Hoescht. Los recuadros muestran la zona ampliada debajo. B, Inmunofluorescencia contra LC3 en cultivo primario de tejido cortical a distintos tiempos (6, 26 y 40 DIV). Los núcleos fueron marcados con DAPI. La barra representa 100 μm (n=3).

Con el objetivo de determinar si el incremento en el número de autofagosomas se debe a la activación de la autofagia o a un bloqueo de su flujo, se determinó la abundancia de BECN1, la cual forma parte del complejo de inicio de la autofagia, y de la proteína adaptadora p62, la cual es degradada dentro del autolisosoma y por lo tanto permite monitorear la degradación autofágica (es decir el flujo). Tanto la expresión de BECN1, indicando activación, como de p62, indicando inhibición del flujo, incrementaron en las neuronas senescentes (26 DIV) respecto a las neuronas jóvenes (6 DIV) o glía senescente (40 DIV) (Figura 12A y 12B). Estos datos nos muestran que durante la senescencia neuronal se activa la autofagia (aumenta BECN1) pero en algún punto se bloquea y por lo tanto no se puede degradar el contenido autofagosomal (acumulación de p62). Dado que el Cyto ID® deja de fluorescer cuando se acidifica y observamos que se acumula su tinción, podemos concluir que durante la senescencia la acumulación de p62 se debe a que se inhibe la fusión de los autofagosomas con los lisosomas.

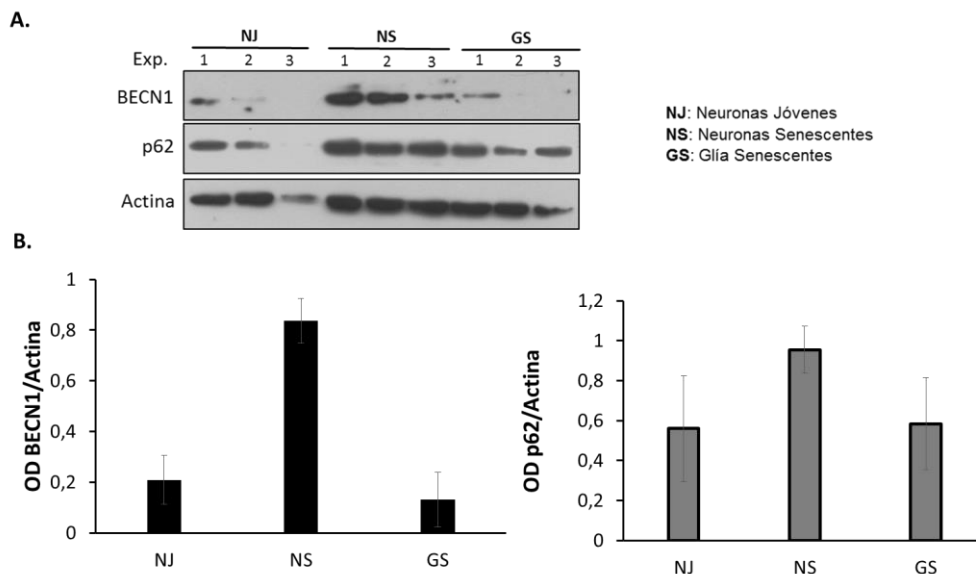
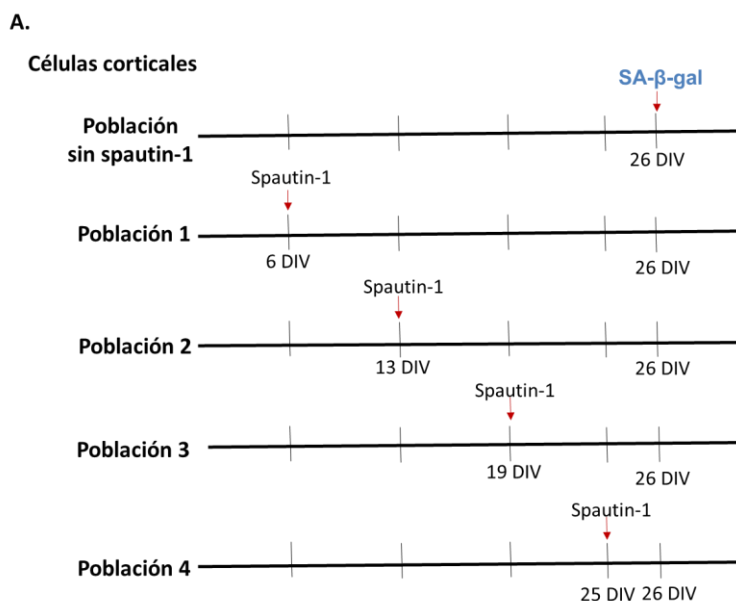


Figura 12. Bloqueo del flujo autofágico en neuronas senescentes. A, Western blot para detectar BECN1 y p62 en neuronas Jóvenes (6 DIV), neuronas senescentes (26 DIV) o glía senescente (40 DIV). Exp. 1, 2, 3 se refiere a muestras de tres experimentos independientes. B, Cuantificación de la densidad de las bandas de BECN1 y p62 correspondiente a los cultivos indicados, normalizados contra la proteína β -actina. Se grafica el promedio y las barras representan la desviación estándar (n=3). OD densidad óptica.

7.4 La inhibición de la autofagia en células jóvenes aumenta el número de células senescentes.

Considerando nuestros resultados en conjunto con los antecedentes sobre fallas en el flujo de la autofagia asociadas al envejecimiento, planteamos la hipótesis de que la disfunción en la autofagia contribuye al establecimiento del fenotipo senescente. Por lo tanto, buscamos inhibir la autofagia de manera temprana y evaluar si eso acelera la aparición de neuronas senescentes. Agregamos Spautin-1, una droga que induce la degradación de miembros del complejo iniciador BECN1/PI3KIII, por ventanas de tiempo a lo largo del cultivo y determinamos el número de células senescentes detectando la actividad SA- β -gal a los 26 DIV, independientemente del momento al que se halla agregado el Spautin-1 (ver esquema del diseño experimental en Fig13A). Efectivamente, los resultados muestran que la inhibición de la autofagia a los 6 o 13 DIV aumentó el número de células positivas a SA- β -gal comparado con el control sin Spautin-1 (Figura 13B y 13C). En cambio, la inhibición de la autofagia cuando el fenotipo senescente ya está establecido no altera el número de células senescentes. Estos resultados confirman que fallas en la autofagia contribuyen al establecimiento de la senescencia neuronal *in vitro*.



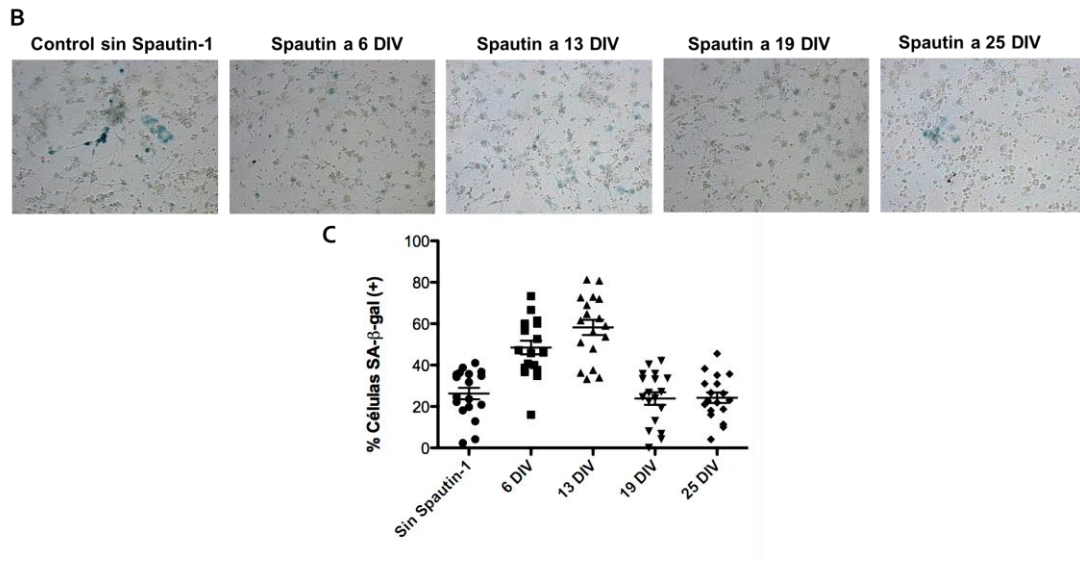


Figura 13. La inhibición de la autofagia en células jóvenes aumenta el número de células senescentes a los 26 DIV. A, Esquema del diseño experimental. B, Fotos representativas en campo claro que muestran la actividad SA-β-gal en cultivo primario de tejido cortical de 26 DIV después del tratamiento con Spautin-1 a los tiempos indicados. C, Cuantificación de células positivas a SA-β-gal después del tratamiento con Spautin-1 mostrado en B. Cada punto representa un campo analizado; se realizaron dos experimentos independientes (n=2) por triplicado y de cada triplicado se observaron 3 campos.

Para demostrar que el tratamiento con Spautin-1 efectivamente inhibe la autofagia se realizó una inmunofluorescencia contra LC3 así como el ensayo de CYTO ID® en células de 26 DIV. Efectivamente, después de 6h y 24h de tratamiento con Spautin-1 se observó menor señal tanto de LC3 punteado como de CYTO ID en comparación con el control sin Spautin-1 (Figura 14A y 14B).

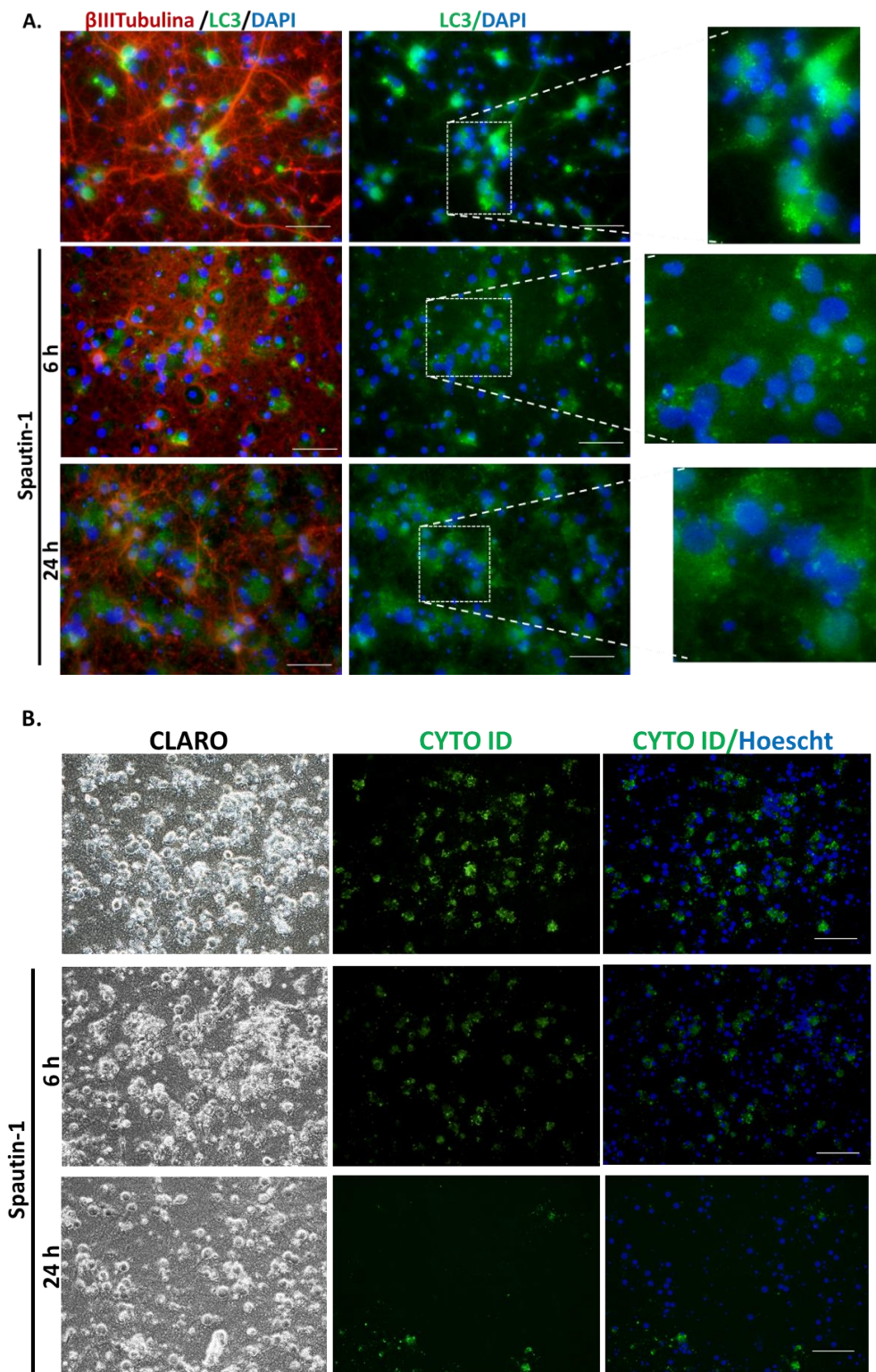


Figura 14. Spautin-1 disminuye la autofagia en células corticales en cultivo. A, Inmunofluorescencia para detectar LC3 en células de 26 DIV tras el tratamiento con Spautin-1. Las neuronas se marcaron detectando la expresión de β -III-tubulina y los núcleos se tiñeron con DAPI. Los recuadros muestran la zona ampliada a la derecha. B, Tinción de CYTO ID (fluorescencia verde) en células de 26 DIV tras el tratamiento con Spautin-1 a los tiempos indicados. Los núcleos fueron marcados con Hoescht. La barra representa 100 μ m.

8. Discusión

En este trabajo partimos de la hipótesis de que la senescencia neuronal fisiológica conlleva al deterioro de las funciones cognitivas, ya que al secretar moléculas pro-inflamatorias podría iniciar el estado de inflamación que se observa en cerebros viejos, y que a su vez esta inflamación, junto con moléculas secretadas por las neuronas senescentes, reforzaría y propagaría la senescencia celular.

Actualmente existe bastante información acerca de la senescencia de células mitóticas. Sin embargo, no se sabe si las células post-mitóticas como las neuronas son capaces de adquirir características senescentes semejantes a las células mitóticas. Un trabajo publicado recientemente demostró que las neuronas en cortes de cerebro de ratones viejos (32 meses de edad), también exhiben varias características del fenotipo senescente, como focos de heterocromatina, daño al DNA, síntesis de interleucina 6, aumento en la actividad SA- β -gal, autofluorescencia, entre otras (Jurk *et al.*, 2012), lo que sugiere que las neuronas senescentes se acumulan con la edad y probablemente contribuyen a la disminución de las funciones cerebrales y a la neurodegeneración asociada al envejecimiento. Una desventaja de estudiar animales viejos, además de que necesitan mantenerse por muchos meses para después ser estudiados, es que se complica descubrir los mecanismos moleculares. Por lo tanto, es necesario desarrollar un modelo de senescencia neuronal que sea viable y que pueda ser estudiado y manipulado a lo largo del tiempo, con la finalidad de entender mecanismos moleculares y celulares de la senescencia neuronal. De acuerdo con esto, los resultados del presente trabajo han demostrado la posibilidad de contar con un modelo de senescencia de neuronas y de glía que reproduce las características senescentes descritas *in vivo*.

Un descubrimiento interesante en este trabajo fue la presencia de marcadores de senescencia como γ H2AX y la expresión de p21 y de IL6, exclusivamente en neuronas a los 26 DIV, aún cuando la mitad de la población celular es glial. Al no estar presentes estos marcadores de senescencia en glía, nos hace pensar en la posibilidad de que las neuronas sean el tipo celular que primero sufre senescencia celular también *in vivo*. Dentro del cultivo primario cortical, probablemente sean las neuronas senescentes las que inducen la senescencia de las células gliales que se observan a los 40 DIV. Este resultado es interesante porque la comunidad científica dedicada a entender el envejecimiento tiende a considerar lo contrario, que es la glía la principal causante de la inflamación y deficiencia funcional de las neuronas (Bhat *et al.*, 2012).

Acorde a la hipótesis del trabajo, encontramos que el medio condicionado de neuronas senescentes (26DIV) induce senescencia en neuronas jóvenes, indicando la presencia del SASP en neuronas senescentes. Esto apoya la propuesta de que la senescencia neuronal podría ser un evento primario del envejecimiento del cerebro. Será interesante estudiar qué moléculas secretadas por las neuronas senescentes tienen el efecto parácrino de

inducción de senescencia en las neuronas jóvenes. También será interesante determinar si el medio condicionado de neuronas senescentes puede inducir senescencia a células de la glía.

Durante el envejecimiento y en enfermedades neurodegenerativas se ha observado que el flujo de la autofagia disminuye, acumulándose autofagosomas. En el modelo de senescencia neuronal que establecimos observamos también un incremento en el número de autofagosomas a los 26 y 40 DIV del cultivo, junto con la acumulación de la proteína p62. Esto sugiere que el bloqueo de la autofagia podría ser una de las causas responsables del establecimiento del fenotipo senescente neuronal. Estos resultados concuerdan con Kang y su grupo (2011) quienes demuestran que la inhibición de la autofagia induce senescencia en fibroblastos de humano, ya que al usar RNAs de interferencia para silenciar a los genes *Atg7*, *Atg12* y *Lamp2* en fibroblastos diploides humanos (HDF) observaron la detención del ciclo celular, el incremento en la actividad β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -gal) y la acumulación de lipofuscina (Kang *et al.*, 2011). En este sentido, la inhibición de autofagia en el cultivo primario cortical por administración de Spautin-1 a tiempos tempranos, antes de que se establezca el fenotipo senescente, causó un incremento en el número de células senescentes a los 26 DIV, confirmando que la disfunción de la autofagia induce senescencia en neuronas corticales en cultivo.

En contraste, Young y col. (2009), silenciaron a los genes *Atg5* y *Atg7* usando RNAs de interferencia (shRNA) en fibroblastos senescentes inducidos por el oncogén *Ras* y observaron una disminución en el porcentaje de células positivas a la actividad SA- β -gal. Este aparente papel contradictorio de la autofagia en el establecimiento de la senescencia podría deberse a que la autofagia se inhibió después de la inducción de senescencia.

Si se toma en cuenta que la autofagia además de eliminar componentes intracelulares de manera selectiva tiene diversas funciones, como favorecer la secreción no convencional, no es posible entender su función pensando solo en la “cantidad” de autofagia, sino en la “calidad” de la autofagia. Podrían ocurrir variaciones en la maquinaria molecular de la autofagia durante el envejecimiento, que favorezcan los cambios asociados al fenotipo senescente. Por ejemplo, la formación del compartimento de acoplamiento espacial TOR-Autofagia (TASCC), una estructura celular descrita en células senescentes inducidas por el oncogén *Ras* y que es esencial para la expresión del SASP, depende de la autofagia (Narita *et al.*, 2011; Young *et al.*, 2011). Aunque aún no ha sido descrita la formación del TASCC en neuronas senescentes, posiblemente el aumento de autofagosomas observado en células corticales de 26 y 40 DIV se deba a su formación. Y probablemente la formación de dicho TASCC disminuya la degradación del contenido autofagosomal y por lo tanto vemos la acumulación de la proteína p62. Sin embargo, se requerirán experimentos que nos permitan demostrar que realmente existe formación del TASCC en neuronas senescentes y que este a su vez contribuye a la expresión del SASP de neuronas senescentes.

En resumen, encontramos condiciones de cultivo primario de células corticales que permiten obtener tanto neuronas como células gliales senescentes, con las

mismas características que las descritas *in vivo*, y que acumulan autofagosomas. Este modelo puede ser usado para investigar el mecanismo celular y molecular involucrado en la senescencia neuronal y glial, así como el mecanismo por el cual la autofagia contribuye en la adquisición del estado senescente neuronal.

9. Conclusiones

- ✚ Las neuronas corticales en nuestro modelo de estudio senescen antes que las células gliales.
- ✚ Tanto neuronas como células gliales senescentes expresan un fenotipo de secreción asociado a senescencia (SASP) capaz de inducir senescencia en neuronas jóvenes.
- ✚ Durante la senescencia tanto neuronal como glial incrementa el número de autofagosomas.
- ✚ La inhibición temprana de la autofagia con Spautin-1 aumenta el número de neuronas corticales senescentes.

10. Perspectivas

Los resultados obtenidos con el medio condicionado demuestran que neuronas senescentes pueden inducir senescencia en neuronas jóvenes. Sin embargo aún quedan bastantes preguntas por resolver, de las cuales concluyo con las que más me interesan.

¿Qué molécula/s dentro del SASP de neuronas senescentes son las responsables de inducir senescencia en neuronas jóvenes?

Valdría la pena analizar si se trata de especies reactivas de oxígeno (ROS), miRNAs, proteínas como interleucinas o factores de crecimiento.

¿El SASP de neuronas senescentes es distinto en composición al SASP de células gliales senescentes?

Una manera de abordarlo sería probando si el SASP de neuronas senescentes es capaz de inducir senescencia en células gliales y viceversa. Se podría saber haciendo experimentos cruzados, en los que se cultiven neuronas o glía joven, con los medios condicionados ya sea de neurona o de glía senescente y comparar el número de células senescentes.

¿Se formará el TASC en neuronas senescentes?

Esto se puede responder analizando la localización subcelular de proteínas que permiten detectar autolisosomas, trans-Golgi y mTOR.

Si encontramos que sí se forma el TASCC en neuronas senescentes, sugiere que la *autofagia senil* contribuye al establecimiento del fenotipo senescente. Si se pudiera restablecer el flujo de la autofagia, ¿Se podría re-activar la *autofagia juvenil* y la senescencia neuronal podría revertirse?

Considerando que la restricción dietética disminuye el número de células senescentes en el cerebro, y que la restricción dietética induce autofagia, esos cambios en la autofagia que promueven la senescencia podrían ser reversibles. Si esta hipótesis es cierta se podría estudiar si al activar la autofagia por hambruna (*autofagia juvenil*) se disminuye tanto el número de neuronas senescentes como la producción del SASP.

¿De qué manera los componentes del SASP son liberados de la neurona senescente para entregar la señal a la célula blanco?

Sería interesante estudiar si es por medio de vesículas extracelulares como los exosomas, ectosomas o microvesículas, o por secreción alternativa mediada por autofagia. Al menos las interleucinas IL6, IL1 β , no tienen péptido señal para ser secretadas por la vía clásica.

11. Literatura Citada

1. Alirezaei M, Kemball CC, Flynn CT, Wood MR, Whitton JL & Kiosses WB. (2010). Short-term fasting induces profound neuronal autophagy. **Autophagy** 6(6):702-710.
2. Baker DJ, Wijshake T, Tchkonja T, LeBrasseur NK, Childs BG, van de Sluis B, Kirkland JL & van Deursen JM. (2011). Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. **Nature** 479(7372):232-236.
3. Berry DL & Baehrecke EH. (2008). Autophagy functions in programmed cell death. **Autophagy** 4(3):359-360.
4. Bhat R, Crowe EP, Bitto A, Moh M, Katsetos CD, Garcia FU, Johnson FB, Trojanowski JQ, Sell C & Torres C. (2012). Astrocyte senescence as a component of Alzheimer's disease. **PLoS One** 7(9): 1-10.
5. Blagosklonny MV. (2011). Cell cycle arrest is not senescence. **Aging** 3(2):94-101.
6. Bouzas RJ, Zárraga GG, Sánchez CMR, Rodríguez VR, Gracida X, Anell-Rendón D, Covarrubias L & Castro OS. (2012). The nuclear receptor NR4A1 induces a form of cell death dependent on autophagy in mammalian cells. **PLoS One** 7(10):1-12.

7. Correia MC, Hewitt G, Passos JF. (2014). Telomeres, oxidative stress and inflammatory factors: partners in cellular senescence? **Longev Healthspan**. 3(1):1.
8. Cuervo AM. Autophagy: in sickness and in health. (2004). **Trends Cell Biol**. 14(2):70-77.
9. Cuervo AM, Bergamini E, Brunk UT, Dröge W, French M & Terman A. (2005). Autophagy and aging: the importance of maintaining "clean" cells. **Autophagy** 1(3):131-140.
10. Cuervo AM & Wong E. (2013). Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. **Cell Res**. 1-13.
11. Debacq-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J & Toussaint O. (2009). Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. **Nature Protocols** 4(12):1798-806.
12. de Cabo R, Carmona GD, Bernier M, Hall MN, Madeo F. (2014). The search for antiaging interventions: from elixirs to fasting regimens. **Cell** 157(7):1515-26.
13. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, Peacocke M & Campisi J. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. **Proc Natl Acad Sci**. 92(20):9363-7.
14. Fontana L, Partridge L & Longo VD. (2010). Extending healthy life span-from yeast to humans. **Science** 328(5976):321-326.
15. Freund A, Orjalo AV, Desprez PY & Campisi J. (2010). Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. **Trends Mol Med**. 16(5):238-46.
16. Golde TE & Miller VM. (2009). Proteinopathy-induced neuronal senescence: a hypothesis for brain failure in Alzheimer's and other neurodegenerative diseases. **Alzheimers Res Ther**. 1(2):1-12.
17. Georgakopoulou EA, Tsimaratou K, Evangelou K, Fernandez Marcos PJ, Zoumpourlis V, Trougakos IP, Kletsas D, Bartek J, Serrano M & Gorgoulis VG. (2013). Specific lipofuscin staining as a novel biomarker to detect replicative and stress-induced senescence. A method applicable in cryo-preserved and archival tissues. **Aging (Albany NY)**. 5(1):37-50.
18. Herbig U, Ferreira M, Condel L, Carey D & Sedivy JM. (2006). Cellular senescence in aging primates. **Science** 311(5765):1257.
19. Hernández GD, Wood CD, Castro OS & Covarrubias L. (2010). Reactive oxygen species: A radical role in development? **Free Radic Biol Med**. 49(2):130-43.

20. Hoare M & Narita M. (2013). Transmitting senescence to the cell neighbourhood. **Nat Cell Biol.** 15(8):887-889.
21. INEGI (2012). Censos de Población y Vivienda, 1990 a 2010. http://www.inegi.org.mx//est/contenidos/Proyectos/graficas_temas/epobla41.htm?s=est&c=29256.
22. Jun JI & Lau LF. (2010). Cellular senescence controls fibrosis in wound healing. **Aging (Albany NY).** 2(9):627-31.
23. Jung T, Höhn A & Grune T. (2010). Lipofuscin: detection and quantification by microscopic techniques. **Methods Mol Biol.** 594:173-193.
24. Jurk D, Wang C, Miwa S, Maddick M, Korolchuk V, Tsolou A, Gonos ES, Thrasivoulou C, Saffrey MJ, Cameron K & von Zglinicki T. (2012). Postmitotic neurons develop a p21-dependent senescence-like phenotype driven by a DNA damage response. **Aging Cell** 11(6):996-1004.
25. Kang HT, Lee KB, Kim SY, Choi HR & Park SC. (2011). Autophagy impairment induces premature senescence in primary human fibroblasts. **PLoS One** 6(8): 1-12.
26. Komatsu M, Ueno T, Waguri S, Uchiyama Y, Kominami E & Tanaka K. (2007). Constitutive autophagy: vital role in clearance of unfavorable proteins in neurons. **Cell Death Differ.** 14(5):887-894.
27. Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC, Kleijer WJ, DiMaio D & Hwang ES. (2006). Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. **Aging Cell.** 5(2):187-95.
28. Lesuisse C & Martin LJ. (2002). Long-term culture of mouse cortical neurons as a model for neuronal development, aging, and death. **J Neurobiol.** 51(1):9-23.
29. Liu J, Xia H, Kim M, Xu L, Li Y, Zhang L, Cai Y, Norberg HV, Zhang T, Furuya T, Jin M, Zhu Z, Wang H, Yu J, Li Y, Hao Y, Choi A, Ke H, Ma D & Yuan J. (2011). Beclin1 controls the levels of p53 by regulating the deubiquitination activity of USP10 and USP13. **Cell**147(1):223-234.
30. López OC, Blasco MA, Partridge L, Serrano M & Kroemer G. (2013). The hallmarks of aging. **Cell** 153(6):1194-1217.
31. Madeo F, Zimmermann A, Maiuri MC & Kroemer G. (2015). Essential role for autophagy in life span extension. **J Clin Invest.** 125(1):85-93.
32. Martinet W, De Meyer GR, Andries L, Herman AG & Kockx MM. (2006). In situ detection of starvation-induced autophagy. **J Histochem Cytochem.**54:85-96.

33. Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T & Ohsumi Y. (2004). In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. **Mol Biol Cell** 15:1101-1111.
34. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM & Klionsky DJ. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. **Nature** 451(7182):1069-1075.
35. Muñoz ED, Cañamero M, Maraver A, Gómez LG, Contreras J, Murillo CS, Rodríguez BA, Varela NI, Ruberte J, Collado M, & Serrano M. (2013). Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. **Cell** 155: 1104–1118.
36. Narita M, Young AR, Arakawa S, Samarajiwa SA, Nakashima T, Yoshida S, Hong S, Berry LS, Reichelt S, Ferreira M, Tavaré S, Inoki K, Shimizu S & Narita M. (2011). Spatial coupling of mTOR and autophagy augments secretory phenotypes. **Science** 332(6032):966-970.
37. Piccioli P & Rubartelli A. (2013). The secretion of IL-1beta and options for release. **Semin Immunol**, 25:425-429.
38. Ponpuak M, Mandell MA, Kimura T, Chauhan S, Cleyrat C & Deretic V. (2015). Secretory autophagy. **Curr Opin Cell Biol**. 35:106-116.
39. Rodier F & Campisi J. (2011). Four faces of cellular senescence. **J Cell Biol**. 192(4):547-556.
40. Rubinsztein DC, Mariño G & Kroemer G. (2011). Autophagy and aging. **Cell** 146(5):682-695.
41. Sánchez CMR, Castro OS, Covarrubias L & Narváez V. (2005). Motoneuronal death during spinal cord development is mediated by oxidative stress. **Cell Death Differ**. 12(3):279-91.
42. Salama R, Sadaie M, Hoare M & Narita M. (2014). Cellular senescence and its effector programs. **Genes Dev**. 28(2):99-114.
43. Sarkar S, Davies JE, Huang Z, Tunnacliffe A & Rubinsztein DC. (2007). Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and alpha-synuclein. **J Biol Chem**. 282(8):5641-5652.
44. Shoji-Kawata S, Sumpster R, Leveno M, Campbell GR, Zou Z, Kinch L, Wilkins AD, Sun Q, Pallauf K, MacDuff D, Huerta C, Virgin HW, Helms JB, Eerland R, Tooze SA, Xavier R, Lenschow DJ, Yamamoto A, King D, Lichtarge O, Grishin NV, Spector SA, Kaloyanova DV & Levine B. (2013). Identification of a candidate therapeutic autophagy-inducing peptide. **Nature** 494(7436):201-6.

45. Storer M, Mas A, Robert MA, Pecoraro M, Ortells MC, Di Giacomo V, Yosef R, Pilpel N, Krizhanovsky V, Sharpe J & Keyes WM. 2013. Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. **Cell** 155:1119–1130.
46. Terman A & Brunk UT. (2004). Lipofuscin. **Int J Biochem Cell Biol.** 36(8):1400-1404.
47. van Deursen JM. (2014). The role of senescent cells in ageing. **Nature** 509(7501):439-446.
48. Van Limbergen J, Stevens C, Nimmo ER, Wilson DC & Satsangi J. (2009). Autophagy: from basic science to clinical application. **Mucosal Immunol.** 2(4):315-330.
49. Wirawan E, Vanden Berghe T, Lippens S, Agostinis P & Vandenabeele P. (2012). Autophagy: for better or for worse. **Cell Res.** 22(1):43-61.
50. Xie Z & Klionsky DJ. (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. **Nat Cell Biol.** 9(10):1102-1109.
51. Yang F, Chu X, Yin M, Liu X, Yuan H, Niu Y & Fu L. (2014). mTOR and autophagy in normal brain aging and caloric restriction ameliorating age-related cognition deficits. **Behav Brain Res.** 264:82-90.
52. Young AR, Narita M, Ferreira M, Kirschner K, Sadaie M, Darot JF, Tavaré S, Arakawa S, Shimizu S, Watt FM & Narita M. (2009). Autophagy mediates the mitotic senescence transition. **Genes Dev.** 23(7):798-803.
53. Young AR & Narita M. (2010). Connecting autophagy to senescence in pathophysiology. **Curr Opin Cell Biol.** 22(2):234-240.
54. Young AR, Narita M & Narita M. (2011). Spatio-temporal association between mTOR and autophagy during cellular senescence. **Autophagy** 7(11):1387-1388.
55. Young AR, Narita M & Narita M. (2013). Cell senescence as both a dynamic and a static phenotype. **Methods Mol Biol.** 965:1-13.

ANEXO 1

Cultivo Primario de Neuronas Corticales

Método para sembrar (para un cultivo/8 o 10 fetos)

Materiales:

- Matraz erlenmeyer de 50 ml
- Vaso de precipitados de 30 ml
- Pipetas serológicas y micropipetas
- Probeta de 100 ml
- Parafilm
- Cajas de 35 mm
- Rata Wistar de 17 días de gestación
- Estuche de disección
- Cajas petri
- Pirinolas con filtro 0,22 μm MILLEX-GSMILLIPORE
- Guillotina
- Periódico
- Microscopio estereoscópico
- Choper o navaja de bisturi o de rasurar.
- Tubos falcón 15 ml
- Jeringa de 20 ml
- Gradilla para tubos falcón
- Pipeta Pasteur
- Malla para disociar PGC Scientifics Cat. 34-1800-01, liga y tubito de jeringa para dispositivo filtrador.

Nota: Todo estéril.

Reactivos:

- NaCl
- KCl
- KH_2PO_4
- NaHCO_3
- Glucosa
- Rojo Fenol
- Agua estériles
- BSA (albúmina de bovino)
- MgSO_4 (Sulfato de magnesio)
- Tripsina-EDTA 10X
- DNAsa
- SBT (inhibidor de tripsina)
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Cloruro de calcio)
- Medio de cultivo neurobasal sin glutamina (Life Technologies)
- B27 (50X) (Life Technologies)
- Gentamicina (0.02 mg/ml) (Life Technologies)
- L-glutamina

- Poly-L-Lisina (PLL)
- Filtros de 500 ml Cat. 430513 Corning
- Glutamax 10X 200 mM
- Etanol

- **KRB 10X**

Preparar 500 ml con agua estéril y almacenar en el refrigerador a 4 °C.

	100 ml	250 ml	500 ml
NaCl	7.07 g	17.67 g	35.35 g
KCl	0.36 g	0.9 g	1.8 g
KH₂PO₄	0.166 g	0.415 g	0.83 g
NaHCO₃	2.14 g	5.35 g	10.7 g
Glucosa	2.57 g	6.42 g	12.85 g
Rojo Fenol	0.015 g	0.037 g	0.075 g

- **Solución 1**

100 ml de KRB 1X (10 ml del stock KRB 10X + 90 ml de agua estéril) + 0.3 g de BSA (Albúmina de bovino) + 0.8 ml del stock de Mg al 3.8 % (3.8 g de Mg en 100 ml de agua estéril).

- **Solución 2**

10 ml de solución 1 + 5 µl de Tripsina-EDTA 10X.

Nota: la tripsina se agrega al momento del experimento, para que no disminuya su acción.

- **Solución 3**

10 ml de solución 1 + 0.8 mg de DNAsa + 5.2 mg de SBT (Inhibidor de tripsina) + 100 µl del stock de Mg al 3.8 %.

- **Solución 4**

10.5 ml de solución 1 + 2 ml de solución 3.

- **Solución 5**

12.5 ml de solución 1 + 15 µl del stock de Ca²⁺ al 1.2% (1.2 g de CaCl₂.2H₂O en 100 ml de agua estéril) + 100 µl del stock de Mg al 3.8 %.

Nota: Preparar las soluciones un día o hasta 3 días antes de sembrar, pero no más de una semana. Se pueden preparar en tubos falcón marcados con 1, 2, 3, 4, 5 o en matraces Erlenmeyer chicos y estériles para no gastar tubos falcón cada vez que se preparen nuevas soluciones. Una vez terminadas las soluciones se tapan con parafilm y se guardan en el refrigerador a 4 °C.

- **Medio de Cultivo Neurobasal (hipocampo y corteza)**

Suplementado con:

BS27 (50X) 2%	1.5 ml	2 ml
Gentamicina (10 mg/ml)	1.5 ml	2 ml
Glutamax 200 mM	112.5 μ l	150 μ l
Aforar con medio neurobasal	75 ml	100 ml

- **XPoly-L-Lisina (PLL) 1X**

Agregar 5 mg de PLL en 20 ml de agua destilada y disolver, luego aforar a 500 ml con agua destilada. Posteriormente filtrar en filtros de 500 ml Cat. 430513 Corning.

Agregar a cada pozo de caja de 12 pozos 1ml de PLL 1X y se dejan incubando 24 h en la incubadora o al menos 2 h antes de sembrar. Con 15 min de incubación es suficiente pero es recomendable incubar las 24 h.

Ratas Wistar de 17 días de gestación

Nota: de 15 a 18 días también se puede trabajar, más grandes no.

1. Calentar las soluciones a 37 °C.
2. En la campana antes de extraer los fetos, colocar 10 ml de la solución 1 (37 °C) en un tubo falcon de 15 ml. Y repartir 8 ml de la sol. 1 en 4 tapas de cajas Petri, filtrando con pirinola.

Nota: La sol.1 se filtra en una pirinola con filtro de 0,22 μ m MILLEX-65 MILLIPORE, antes de agregar a los tubos falcon o cajas petri.

3. Llevar una tapa con solución 1 a donde está la rata porque es ahí donde se van a colocar los fetos.
4. Sacar la guillotina y poner una cama de periódico al lado.
5. Cortar la cabeza de la rata con ayuda de la guillotina (no está anestesiada) y ponerla boca abajo en la tarja y esperar a que se desangre.
6. Colocar a la rata boca arriba en una cama de periódico, limpiar el vientre con alcohol y abrir el vientre con tijeras para sacar los fetos.
7. Extraer el útero con los fetos con pinzas y colocarlos en la caja de Petri que contiene la solución 1.
8. Envolver a la rata en periódico y guardar a -30 grados para después llevarla al bioterio. Limpiar la sangre de la guillotina y la tarja con agua.
9. Llevar la caja petri con los fetos a la campa de flujo laminar.
10. Sacar a los fetos de sus bolsitas con ayuda de las pinzas y colocarlos uno por uno en otra de las tapas petri.
11. Tomar a los fetos y colocarlos hacia el frente hacia ti y quitarles el cerebro cortando a la mitad de la cabeza.
12. Colocar los cerebros en otra tapa petri.

13. Poner la caja petri con los cerebros en un microscopio estereoscópico dentro de la campana.
14. Desdoblar los bulbos del cerebro con pinzas y extraer solo la corteza cortando y evitando llevarse las meninges y el hipocampo.
15. Colocar la corteza en otra tapa petri que contiene la solución 1.
16. Cortar/filetear con un aparato choper. Si no se tiene el aparato, filetear el tejido con una navaja o con un bisturí.
17. Transferir el tejido fileteado al tubo falcón que contiene los 10 ml de la sol. 1 previamente filtrada con pirinola.
18. Centrifugar 3000 rpm x 3 min.
19. Eliminar el sobrenadante con la bomba de vacío dejando un poco de medio para evitar llevarse la pastilla de células.
20. Agregar la solución 2 utilizando una jeringa y acoplándole la pirinola para filtrar la solución hasta que llegue a 7 ml en el tubo falcón.
21. Después se agregan 5 μ l de tripsina-EDTA y agitar vigorosamente con la mano e inmediatamente poner otros 7 ml pero de sol. 4 (filtrada).
22. Agitar vigorosamente con la mano y centrifugar a 3000 rpm x 3 min.
23. Eliminar el sobrenadante con la bomba dejando poco medio y agregar 5 ml de la sol. 3 filtrándola con la pirinola.
24. En otro tubo falcón de 15 ml, colocar 5 ml de la sol. 5 filtrándola con la pirinola. Y dejarlo en una gradilla.
25. Se disgregan las células del tubo que contiene la pastilla pipeteando arriba y abajo muchas veces con una pipeta Pasteur estéril.
26. Tomar las células disgregadas y el medio con la misma pipeta pasteur y transferirlas a un tubito con malla de acuario que se coloca dentro de un vaso de precipitados chico (todo estéril).
27. Pipetear varias veces con la pipeta Pasteur dentro del tubo con malla hasta disgregar y filtrar todo el tejido.
28. El filtrado del vaso de precipitados se transfiere al tubo de la sol. 5 y se centrifuga a 3000 rpm x 3 min.
29. Succionar el sobrenadante y agregar 10 ml de medio neurobasal suplementado filtrándolo también con ayuda de la pirinola.
30. Agitar el tubo vigorosamente y luego contar las células en la cámara de Neubauer. Agregando 10 μ l de la suspensión de células y 10 μ l del azul de tripano en un tubo eppendorf de 0.6 ml. Mezclar y colocar en la cámara de Neubauer.
31. Sacar las cajas con la PLL de la incubadora y succionar la PLL con la bomba de vacío sin tocar el fondo. Sembrar el número deseado de células en cada pozo deslizándolas por la pared para no romper la PLL.

Sembrar:

- Sembrar 400 mil células por pozo en cajas de 12 pozos. En 1 ml de medio neurobasal.
- Sembrar 1 millón de células en cajas de 35mm. En 3 ml de medio neurobasal.

- Sembrar 3.5 millones de células en cajas de 10 cm. En 10 ml de medio neurobasal.

El medio neurobasal se filtra con la pirinola y se agregan 60 μ l de gentamicina por cada 10 ml de medio neurobasal.

ANEXO 2

Protocolo de detección de actividad de la enzima β -galactosidasa asociada a senescencia

Día 1

1. Eliminar todo el medio de los pozos
2. Lavar las células con PBS 1X dos veces.
3. Fijar 5min a temperatura ambiente con formaldehído 2% + glutaraldehído 0.2% en PBS.
4. Succionar la solución de fijación.
5. Lavar las células con PBS 1X dos veces.
6. Agregar la solución de tinción (1 ml por pozo de caja de 12 pozos)
7. Incubar de 12 a 16 h a 37°C. NO en incubadora de CO₂.

NOTA: El color azul es detectable en algunas células dentro de 2 horas, pero la tinción máxima se alcanza de 12 a 16 horas.

Día 2

1. Eliminar la solución de tinción de los pozos.
2. Lavar las células con PBS 1X dos veces.
3. Lavar 1 vez con 500 μ l de metanol y dejar secar al aire libre.
4. Teñir con 500 μ l de Ioduro de propidio (1 mg/ml) durante 10 min.
5. Remover el Ioduro de propidio, lavar con PBS 1X una vez.
6. Almacenar con 1ml de PBS 1X por pozo a 4°C.

Solución de tinción:

Componentes	Volumen (ml)	Concentración final
20mg/ml X-gal en dimetilformamida	1	1 mg/ml
Buffer de fosfato de sodio/ácido cítrico, 0.2 M pH=6 (importante)	4	40 mM
Ferrocianuro de potasio 100 mM	1	5 mM
Ferricianuro de potasio 100 mM	1	5 mM
Cloruro de sodio 5 M	0.6	150 mM
Cloruro de magnesio 1M	0.04	2 mM
Agua	12.4	20 ml vol. total

Buffer de fosfato de sodio/ácido cítrico, 0.2 M (100 ml):

36.85 ml de solución de ácido cítrico 0.1 M

63.15 ml de solución de fosfato de sodio dibásico 0.2 M

Verificar pH=6.

Solución de ácido cítrico (0.1 M)= 2.1 g/100 ml de monohidrato de ácido cítrico ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$).

Solución de fosfato de sodio (0.2 M)= 2.84 g/100 ml de fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4).

NOTA: Almacenar la solución X-gal a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. El buffer y las sales pueden ser preparadas varios días o semanas antes de tiempo. Sin embargo, X-gal no es estable en solución acuosa, así que adicionarlo el día del ensayo, no antes.

ANEXO 3

INMUNOFLUORESCENCIA

Soluciones

Paraformaldehído 4% en PBS (10 ml)

Agregar 20 μ l de NaOH 5N a 4.5 ml de agua bidestilada y calentar a 65° C en tubo Falcon de 15 ml.

Agregar 400 mg de Paraformaldehído, agitar hasta disolverlo.

Dejar enfriar y añadir 5 ml de PBS 2X.

Ajustar el pH a 7.2 con HCl.

Aforar a 10 ml con agua bidestilada.

Filtrar con membrana de 0.22 μ m.

Guardar a 4° C hasta 1 semana, o en alícuotas congelar a - 20° C.

Usar guantes, cubrebocas y bata al pesar el paraformaldehído, pues es muy tóxico.

PBS/Tritón 0.5% (10 ml)

50 μ l de Tritón X-100

9.950 ml de PBS en tubo Falcon de 15 ml.

Almacenar a temperatura ambiente.

PBS/ suero de oveja 4%/ BSA 4% (10 ml)

Disolver 400 mg de BSA en 9 ml de PBS en tubo Falcon de 15 ml.

Agregar 400 μ l de suero de oveja sin inactivar.

Aforar a 10 ml con PBS.

Almacenar a 4° C hasta 1 mes.

PBS/ BSA 2% (10 ml)

Disolver 200 mg de BSA en 9 ml de PBS.

Aforar a 10 ml con PBS.

Almacenar a 4° C hasta 1 mes.

DAPI 1 mg/ml (1000x)

Disolver 1 mg de DAPI (SIGMA D 9542) en 1 ml de agua bidestilada.

DAPI 1 μ g/ml

Disolver 1 μ l de DAPI (1 mg/ml) en 1 ml de PBS 1X

Procedimiento

Día 1

1. Retirar el medio, sacar los cubreobjetos con ayuda de pinzas y colocarlos en una superficie de parafilm. Lavar con 130 μ l PBS 1X, un cubre a la vez.

2. Fijar las células con 130 μ l por cubre de PFA 4%, durante 30 minutos a temperatura ambiente.

3. Retirar el PFA y lavar con PBS 1X 3 veces.

4. Permeabilizar con 130 μ l por cubre de PBS/Tritón 0.5% por 5 minutos a temperatura ambiente.

5. Lavar con PBS 1X 2 veces
6. Bloquear durante 30 minutos con PBS/ suero de oveja 4%/ BSA 4%.
7. Diluir el anticuerpo primario en 130 µl de PBS/BSA 2% y una vez concluido el bloqueo incubar con el anticuerpo primario durante toda la noche (14-16 horas) a 4° C en cámara húmeda.

Tabla 1. Lista de anticuerpos primarios utilizados en los ensayos de inmunofluorescencia.

Anticuerpo	Dilución	Fuente
Anti-Tuj-1	1:1000	abcam ab14545, mouse
Anti-GFAP	1:1000	Dako Z0334, rabbit
Anti-p21	1:25	abcam ab7960, rabbit
Anti-IL6		abcam ab52915, rabbit
Anti-γH2A.X	1:500	abcam ab26350, mouse
Anti-LC3	1:500	MBL PD014, rabbit
Anti-LAMP2	1:250	(c-20) sc8100, goat
Anti-mTOR	1:200	CST (7C10) 2983, rabbit
Anti-Tuj-1	1:500	MRB-435P-100, rabbit
Anti-GFAP	1:1000	Invitrogen 13-0300, rat
Anti-p62	1:500	Cell signalling 5114S, rabbit
Anti-BECN1	1:2000	Sigma PRS3613, rabbit

Día 2

8. Lavar con 130 µl de PBS 1X 3 veces 10 min cada lavado en agitación.
9. Diluir el anticuerpo secundario acoplado al fluoróforo en 130 µl PBS/BSA 2% e incubar 30 minutos a temperatura ambiente.

Tabla 2. Lista de anticuerpos secundarios utilizados en los ensayos de inmunofluorescencia.

Anticuerpo	Dilución	Fuente
Anti-rabbit 488	1:500	Alexa Fluor, A11034, goat
Anti-mouse 488	1:500	Alexa Fluor, A11029, goat
Anti-rabbit 594	1:500	Alexa Fluor, A11037, goat
Anti- mouse 594	1:500	Alexa Fluor, A11032, goat
Anti-rabbit 594	1:500	Alexa Fluor, A21442, chicken
Anti-goat 488	1:500	Alexa Fluor, A11055, donkey
Anti-rat 488	1:500	Alexa Fluor, A21208, donkey
Anti- rabbit	1:1000-5000	Jackson immuno Research, III-035-003

10. Lavar con 130 µl de PBS 1X.
11. Incubar por 2 minutos a temperatura con 130 µl DE DAPI 1 µg/ml.
12. Lavar con 130 µl PBS1X 2 veces. Se puede dejar en PBS a 4°C en cámara húmeda para su observación posterior.
13. Montar con una gota de medio de montaje (VectaShield, Vector Laboratories #H-1000), dejando caer el cubre objetos de lado cuidando que no se hagan burbujas ni se embarre. Sellar las orillas con barniz de uñas transparente. Guardar protegidos de la luz a 4°C.