



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

PAPEL DE LA AUTOFAGIA DURANTE LA SENESCENCIA NEURONAL

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor 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. Agosto, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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, del “Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado” (PAEP), "The Company of Biologists Traveling Fellowship" y de los proyectos PAPIIT-UNAM IN206015 y IN206518; CONACyT CB2013-220515 y FC-921; RECITES INGER-DI-CRECITES-008-2018.

Agradecimientos Institucionales

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

Dr. Abraham Rosas Arellano, M.C. Rodolfo Paredes Díaz y Dra. Ruth Rincón Heredia de la Unidad de Imagenología del IFC, por la microscopía electrónica y confocal.

Ana María Escalante, Francisco Pérez – Cómputo

Al Ing. Aurey Galván Lobato y al Ing. Manuel Ordínez 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.

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

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. ¡¡Y a Sofí, la nueva integrante que llegó a alegrar a la familia!!

Agradecimientos Personales

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 de mi Comité Tutoral, quienes contribuyeron con sus observaciones y compartieron su experiencia conmigo durante todo el desarrollo del trabajo aquí presentado.

A Elisa, Pilar, Gabriel, Cristian, Miguel, Jorge, Melanie y Bety por su enorme ayuda y orientación durante la realización de mis experimentos y por su excelente amistad. Sin ellos, el doctorado no hubiera sido una de las mejores etapas de mi vida.

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

Contenido

1. Introducción	12
1.1. Senescencia Celular	12
1.2. Autofagia	16
1.2.1. Autofagia Mediada por Chaperonas	17
1.2.2. Microautofagia endosomal	18
1.2.3. Macroautofagia	18
1.2.4. Maquinaria Central de la Macroautofagia	18
1.2.5. Funciones de la Autofagia	20
1.3. Autofagia y Senescencia Celular	21
2. Antecedentes	21
2.1. Senescencia Neuronal y Autofagia	21
3. Justificación	22
4. Hipótesis	22
5. Objetivos	23
6. Material y Métodos	23
6.1. Cultivo de neuronas corticales de rata Wistar	23
6.2. Conteo celular y edición de imágenes	23
6.3. Viabilidad celular	23
6.4. Actividad SA-β-gal	23
6.5. Detección de lipofuscina	24
6.6. Inmunofluorescencia	24
6.7. Detección de autofagosomas con Cyto ID kit (ENZ-51031:K200) y tinción con Lysotracker	24
6.8. Obtención de medio condicionado	25
6.9. Tratamiento de células corticales con Spautin-1	25
6.10. Western blot	25
6.11. Microscopía electrónica	25
6.12. Análisis de expresión genética	26
6.13. Ensayo cometa	26
6.14. Análisis del SASP de células corticales	27
6.15. Análisis estadísticos	27
7. Resultados	27
7.1. Las neuronas corticales mantenidas in vitro por largo tiempo adquieren características senescentes	27

7.2. <i>Las neuronas corticales senescentes desarrollan un fenotipo secretor (SASP neuronal)</i>	30
7.3. Las alteraciones en el flujo autofágico contribuyen al desarrollo del fenotipo senescente en neuronas corticales	32
8. Discusión	37
9. Conclusión	38
10. Perspectivas	39
11. Literatura Citada	44
ANEXO 1	51
Cultivo Primario de Neuronas Corticales	51
ANEXO 2	55
Protocolo de detección de actividad de la enzima β-galactosidasa asociada a senescencia 55	
ANEXO 3	57
Inmunofluorescencia	57
ANEXO 4	59
Publicaciones generadas durante el desarrollo del proyecto de investigación	59
ANEXO 5	61
ANEXO 6	69

Role of autophagy during neuronal senescence

Abstract

Cellular senescence is a phenotype characterized by a cell cycle arrest and molecules that influence surrounding tissue due to the secretion of growth factors, metalloproteinases and pro-inflammatory molecules. Cellular senescence is induced by different stimuli, including telomere shortening, reactive oxygen species, DNA damage, oncogene activation and developmental cues. While senescent cells have a transient physiological role, in aging, they are not efficiently cleared by the immune system leading to their accumulation in old tissues. Persistent senescent cells contribute to aging and age-related diseases since they modify the cell's microenvironment, promote local inflammation and induce paracrine senescence, spreading the senescent phenotype along old tissues; therefore, it is fundamental to understand the molecular mechanisms of cellular senescence establishment and maintenance. To date, most of the knowledge related to cellular senescence has been collected through the study of mitotic cells, and it has been theorized that post-mitotic cells are incapable of entering into a senescent state. Nevertheless, neurons with several senescent features have been observed in old mice and human brain, although the molecular mechanisms that induce neuronal senescence are unknown. Since alterations in autophagic flux have been observed during brain aging and neurodegenerative disorders, we hypothesized that autophagy dysfunction could contribute to neuronal senescence establishment.

In this study, we developed an *in vitro* model of neuronal senescence in long-term primary culture of rat cortical cells, in which we observed neurons with several senescence-related features, together with a deficient autophagic degradation. In agreement with our hypothesis, we found that autophagy induction decreased the number of senescent neurons, whereas autophagy inhibition increased them, supporting the notion that autophagy dysfunction induces neuronal senescence.

Key words: Neurons; Autophagy; Cellular senescence; Aging

Papel de la autofagia durante la senescencia neuronal

Resumen

La senescencia celular es un proceso que fenotípicamente se caracteriza por la detención del ciclo celular y la secreción de moléculas que influyen en el tejido circundante, debido a la secreción de factores de crecimiento, metaloproteinasas de matriz y moléculas pro-inflamatorias. La senescencia celular puede ser inducida por diferentes estímulos, como: el acortamiento de los telómeros, aumento de especies reactivas de oxígeno, daño al DNA, activación oncogénica y señales durante el desarrollo embrionario. Si bien las células senescentes tienen un papel fisiológico transitorio, en el envejecimiento no son eficientemente eliminadas por el sistema inmune, dando lugar a su acumulación en los tejidos viejos. Ahí, estas células pueden modificar el microambiente, promover una inflamación local, inducir senescencia parácrina y propagar el fenotipo senescente a lo largo de todo el tejido. La acumulación de células senescentes contribuye al envejecimiento y a las enfermedades asociadas al envejecimiento, por ello, es fundamental entender los mecanismos moleculares implicados en el establecimiento y el mantenimiento de la senescencia celular. Hasta la fecha, la mayor parte del conocimiento relacionado con la senescencia celular ha sido obtenido a través de estudios en células mitóticas y se piensa que las células postmitóticas son incapaces de entrar en un estado senescente. A pesar de ello, se han observado neuronas con varias características senescentes en cerebros viejos de ratones y humanos. Sin embargo, el mecanismo molecular que activa la senescencia neuronal aún se desconoce. Debido a que se han encontrado alteraciones en el flujo autofágico durante el envejecimiento del cerebro y en enfermedades neurodegenerativas, nosotros hipotetizamos que el fallo en la autofagia podría contribuir al establecimiento de la senescencia neuronal.

En este trabajo, desarrollamos un modelo *in vitro* de senescencia neuronal a partir de cultivos primarios de células corticales de rata, en el cual, observamos neuronas con varias características del fenotipo senescente, junto con una deficiente degradación autofágica. De acuerdo con nuestra hipótesis, encontramos que la inducción de autofagia disminuye el número de neuronas senescentes, mientras que su inhibición aumenta la cantidad de dichas células. Estos resultados sugieren que las alteraciones en la actividad autofágica podrían actuar como un posible inductor de la senescencia neuronal.

Palabras Clave: Neuronas; Autofagia; Senescencia Celular; Envejecimiento.

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>
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
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 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
RC	Restricción calórica
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

Durante el envejecimiento ocurre un conjunto de cambios a nivel de órganos, tejidos, células y moléculas, que disminuye la capacidad del organismo para adaptarse ante diversos estímulos y aumenta la probabilidad de morir. 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 otras¹.

Algunos de los cambios celulares y moleculares que ocurren durante el envejecimiento son: el acortamiento de los telómeros, agotamiento de las células troncales, alteraciones epigenéticas, pérdida de la regulación de proteostasis, disfunción mitocondrial, senescencia celular e inestabilidad genómica². Varias de estas características pueden ser consecuencia del mal funcionamiento de un mismo proceso celular: **la autofagia**.

La autofagia es una vía catabólica que degrada componentes intracelulares a través de los lisosomas, convirtiéndolos en biomoléculas básicas que después serán recicladas en el citosol o secretadas por la célula³. Esta característica permite a la autofagia influir en procesos celulares como proliferación, diferenciación y muerte celular⁴⁻⁶. Sin embargo, con el envejecimiento la actividad autofágica disminuye en muchos tejidos, haciendo más susceptible a un organismo de adquirir enfermedades como cáncer o enfermedades neurodegenerativas⁷⁻¹⁰.

La restricción calórica aumenta la longevidad en todas las especies en las que se ha probado o evaluado. Dado que la restricción calórica es el principal inductor de autofagia, es razonable considerar que la autofagia sea uno de los procesos involucrados en dicho incremento en la longevidad. De hecho, también en diversas especies, la inducción de la autofagia por otros estímulos (distintos a la restricción calórica o déficit de nutrientes) aumentan la longevidad (ej. Rapamicina, resveratrol)⁸. No es de sorprender, entonces, que la eficiencia de la autofagia disminuya con el envejecimiento⁷. Deficiencias de la autofagia en el SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC) llevan a la acumulación de agregados proteicos y a la muerte neuronal¹¹. Sin embargo, aún no es claro cómo y por qué suceden estos cambios en la autofagia durante el envejecimiento.

1.1. Senescencia Celular

La senescencia celular es un fenotipo que puede ser adquirido por cualquier tipo celular (hasta la fecha no se han encontrado excepciones) y está caracterizada por la detención del ciclo celular y la secreción de moléculas que pueden afectar el tejido circundante. Tiene funciones fisiológicas y patológicas. En condiciones patológicas, una gran variedad de tipos de estrés, tanto extrínsecos como intrínsecos, pueden inducir senescencia celular, incluyendo daño al DNA, estrés oxidante, acortamiento de telómeros, exposición a agentes genotóxicos, hipoxia, activación de oncogenes, inactivación de supresores de tumor, estrés epigenético, entre otros¹². Actualmente, no existe un marcador específico de senescencia celular, sin embargo las células senescentes exhiben una gran variedad de características fenotípicas que en conjunto definen al estado senescente (Figura 1) y se resumen a continuación (revisado en ¹³⁻¹⁷):

- **Detención del ciclo celular**

Comúnmente involucra la inhibición de la actividad de cinasas dependientes de ciclina (cdk) por la acción de las proteínas p21^{CIP/WAF1}, p16^{INK4A} o ambas. p21^{CIP/WAF1} inhibe a la CDK2 y p16^{INK4A} inhibe al complejo CDK4/6, lo cual bloquea la inactivación de la proteína RB, resultando en represión continua de los genes blanco del factor de transcripción E2F, necesarios para la síntesis del DNA y la transición a la fase S¹⁷.

▪ **Fenotipo Secretor 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 secretor asociado a senescencia)¹⁸⁻²⁰. Entre estos factores se encuentran numerosas citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, proteasas y especies reactivas de oxígeno¹⁸. 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 células vecinas sanas; (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 premalignas²⁰. Uno de los principales reguladores del SASP es la cinasa p38MAPK, la cual se encuentra activa en células senescentes²¹. Al inhibir a p38MAPK se disminuye la secreción de casi todos los componentes del SASP, entre ellos interleucina 6 (IL6) y 8 (IL8). El factor de transcripción NF-kB es el efector de la señalización de p38MAPK, ya que regula la expresión de varios componentes del SASP como IL6, IL8, IL1β, entre otros y su activación depende de la actividad de p38MAPK²¹.

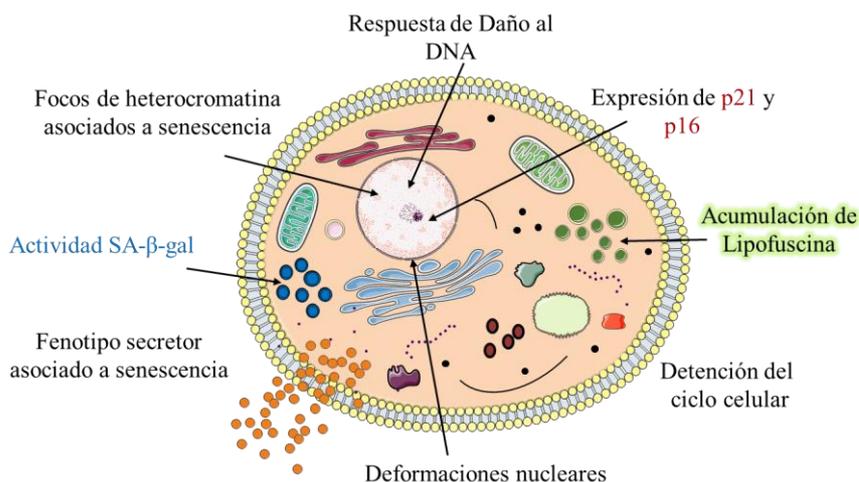


Figura 1. Características de las células senescentes. El fenotipo senescente puede desencadenarse por la acción de distintos tipos de estímulos como, el acortamiento de telómeros, estrés replicativo, estrés oxidante activación oncogénica y en condiciones fisiológicas por señales durante el desarrollo embrionario. Las células senescentes exhiben una persistente respuesta de daño al DNA (DDR, en inglés), focos de heterocromatina, acumulación de lipofuscina, aumentan la actividad de la enzima β-galactosidasa (SA-β-gal) y la expresión de inhibidores del ciclo celular como p21^{CIP/WAF1} y p16^{INK4A}. Además secretan una gran cantidad de factores como interleucinas, quimiocinas, factores de

crecimiento, metaloproteinasas, entre otros. A esta característica se le conoce como fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP, por sus siglas en inglés).

- **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 es 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 senescencia²².
- **Formación de focos de heterocromatina asociados a senescencia.**
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 para proteínas con función proliferativa (genes del ciclo celular) y por otro lado en la activación de genes que contribuyen a senescencia como genes del fenotipo secretor senescente (SASP, se describe adelante)²³
- **Daño en el DNA**
El daño al DNA ya sea por rompimiento de cadena o por acortamiento de los telómeros, activa lo que se conoce como respuesta al daño al DNA (DDR, por sus siglas en inglés) que se ha asociado a la senescencia por inducir detención del ciclo celular y la activación de las vías p53, p21^{CIP/WAF1} y la MAPK p38. Esta última a su vez, aumenta la actividad del factor de transcripción NF-kB, el cual regula la expresión de una gran cantidad de genes, entre ellos citocinas proinflamatorias como IL6 e IL8²⁴. La respuesta al daño del DNA puede ser visualizada por marcadores específicos como 53BP1 y la histona fosforilada γ H2AX²³.
- **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. Durante el envejecimiento y en la senescencia celular, las células acumulan grandes cantidades de lipofuscina que no puede ser eliminada^{25,26}. Una de las características de la lipofuscina es su autofluorescencia.
- **Alteraciones nucleares**
En las células senescentes ocurren numerosos cambios fenotípicos en el núcleo, por ejemplo, la pérdida de proteínas de la envoltura nuclear como la lamina B1, la lamina A, el receptor de la lamina B (LBR) y la proteína de la membrana nuclear interna MAN1. La pérdida de estas proteínas resulta en alteraciones en la estructura de la envoltura nuclear, caracterizadas por la presencia de invaginaciones nucleares y residuos intranucleares de laminas que dan la apariencia de un núcleo arrugado^{27,28}.

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).

Tabla 1. Lista de algunos marcadores de senescencia celular
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 (p21 ^{CIP/WAF1} y p16 ^{INK4A} , etc.)
Respuesta de daño al DNA (ATM, 53BP1, γ H2AX)
Componentes del SASP (IL6, IL8, MMPs, etc.)
Activación de p53
Reducción de lamina B1
Actividad transcripcional de NF- κ B
Activación de p38MAPK
Acumulación de lipofuscina (autofluorescencia o tinción con Sudán Black)

Senescencia Fisiológica

El proceso de senescencia celular presenta una gran relevancia fisiológica. Por ejemplo, se han identificado células con características senescentes en muchas estructuras anatómicas transitorias durante el desarrollo embrionario y parecen jugar un papel muy importante en la remodelación tisular durante la organogénesis. Estas células expresan SA- β -gal, la detención de su ciclo celular depende de p21^{CIP/WAF1} y no de p53, ni de p16^{INK4A}, no muestran daño en el DNA y además secretan un grupo de citocinas específico que difiere de las citocinas típicas del SASP. Así, este tipo de senescencia corresponde a un mecanismo celular programado con un papel fisiológico que contribuye al desarrollo embrionario^{29,30}.

Las células senescentes también contribuyen a la cicatrización, ya que se ha observado la aparición de características senescentes, como la expresión de p16^{INK4A}, la activación de NF- κ B y la expresión de citocinas del SASP en sitios de heridas y la eliminación de células que expresan a p16^{INK4A} retrasa dicha cicatrización^{31,32}. Además y de manera muy interesante, se ha observado inducción de senescencia celular durante la regeneración de extremidades de las salamandras y del pez cebra, asociada con la reparación y la regeneración de tejidos^{33,34}.

El proceso de senescencia celular es conocido ampliamente como un mecanismo celular que evita la progresión tumoral y el cáncer^{35,36}. La activación de oncogenes, como Ras o BRAF, desencadenan un tipo de senescencia celular conocido como senescencia celular inducida por oncogenes (OIS, por sus siglas en inglés). Este tipo de senescencia está caracterizado por la presencia de focos de heterocromatina asociados a senescencia (SAHF, por sus siglas en inglés), expresión de p16^{INK4A} y p53, así como una activada y persistente respuesta de daño al DNA^{12,37,38}.

Senescencia Patológica

Una característica de los organismos viejos es la acumulación de células senescentes debido a que no son eliminadas eficientemente por el sistema inmune³⁹. La excesiva acumulación de células senescentes afecta negativamente la función tisular, debido en gran parte a la secreción de los componentes del SASP que afecta las capacidades regenerativas y crea un ambiente pro-inflamatorio favorable para el inicio y la progresión de muchas de las enfermedades asociadas al envejecimiento como ciertos tipos de neurodegeneración y el cáncer^{16,40-42}. En este sentido, que una expresión elevada de p16^{INK4} (generalmente asociada con los cambios epigenéticos que ocurren durante el establecimiento del fenotipo senescente, los cuales permiten su des-represión transcripcional⁴³⁻⁴⁵) se observe en la mayoría de las células senescentes permitió demostrar el papel de la senescencia en el envejecimiento del organismo. Lo anterior se demostró al eliminar selectivamente a las células senescentes en el ratón transgénico INK-ATTAC que expresa 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 ojo⁴⁶.

Estos hallazgos llevaron al desarrollo de moléculas pequeñas conocidas como senolíticos, que tienen la capacidad de eliminar células senescentes y que están siendo actualmente investigadas para usarlas como estrategia terapéutica contra enfermedades asociadas al envejecimiento^{47,48}. Por ejemplo, la eliminación de células senescentes usando senolíticos disminuyó la fosforilación y los agregados de Tau en un ratón modelo de neurodegeneración dependiente de Tau⁴⁹. Asimismo, el uso de senolíticos redujo el desarrollo de osteoartritis en ratones. Usando explantes y cultivos *in vitro* obtenidos de pacientes con osteoartritis se confirmaron estos efectos ya que los senolíticos disminuyeron la expresión de marcadores de senescencia, de inflamación y además aumentaron la expresión de proteínas de la matriz extracelular en el tejido cartilaginoso⁵⁰. Estos datos muestran la relevancia clínica del potencial uso de senolíticos contra enfermedades asociadas al envejecimiento.

1.2. 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 célula³. 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 endosomal y macroautofagia**⁵¹ (Figura 2).

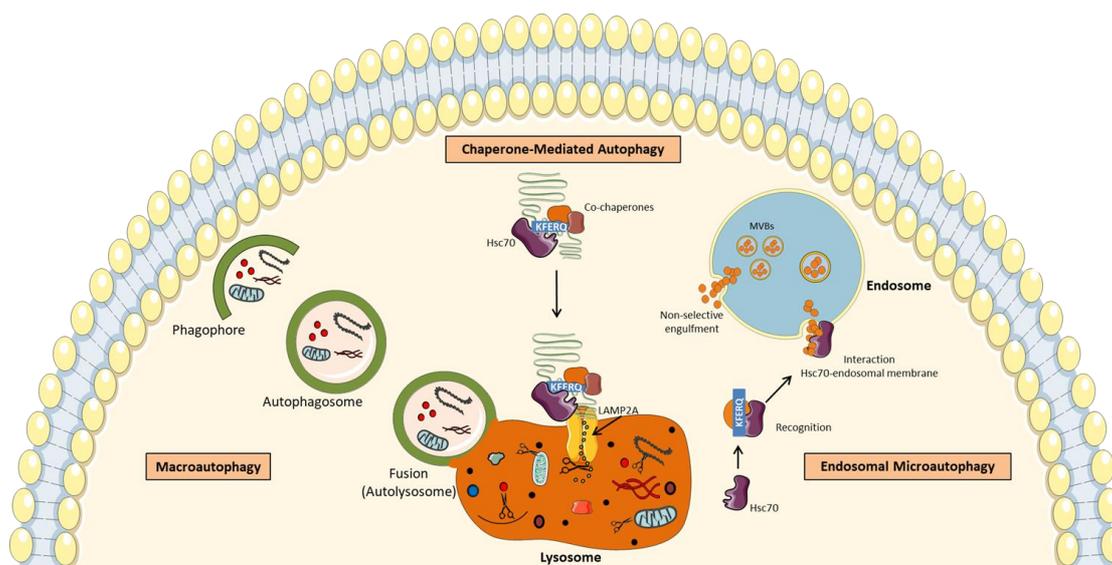


Figura 2. Representación esquemática de los distintos tipos de autofagia (Tomada de Muciño-Hernández *et al.*, en preparación).

1.2.1. 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^{9,52,53}. La interacción de la chaperona con la proteína blanco ocurre a través de un motivo de 5 aminoácidos conocido como KFERQ. Este motivo está compuesto generalmente de un residuo de glutamina (Q) ya sea al inicio o al final del motivo, un residuo cargado positivamente que puede ser lisina (K) o arginina (R), un aminoácido hidrofóbico, ya sea fenilalanina (F), valina (V), leucina (L) o isoleucina (I) y un residuo cargado negativamente, ya sea ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D). La secuencia puede variar, pero las propiedades fisicoquímicas deben mantenerse. Aproximadamente 40 % de las proteínas del proteoma de mamíferos contiene un motivo canónico tipo KFERQ y además por modificaciones postraduccionales como fosforilación y acetilación se pueden generar motivos tipo KFERQ, aumentando así el número potencial de sustratos de CMA⁵⁴.

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 oligomerización 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 con ayuda de una chaperona que reside normalmente en el lumen del lisosoma, Hsc70 (lys-Hsc70), donde la proteína es finalmente degradada por enzimas hidrolíticas^{9,52} (Figura 2).

1.2.2. Microautofagia endosomal

Existe poca información acerca de los mecanismos y componentes moleculares que participan en la microautofagia endosomal. En esta vía, las proteínas citosólicas son transportadas e internalizadas en los endosomas tardíos, ya sea de manera no selectiva o internalizando proteínas específicas que contienen un motivo tipo KFERQ con ayuda de la chaperona citosólica Hsc70 (Figura 2), donde finalmente son degradadas en el lumen endosomal^{55,56}.

1.2.3. 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 organelos y algunos patógenos⁵⁷. En respuesta a varios estímulos, como por ejemplo, reducción de nutrientes, factores de crecimiento, hormonas, niveles de ATP, hipoxia, acumulación de proteínas mal plegadas y muchos más una **membrana de aislamiento** (también conocida como **fagóforo**) se elonga gradualmente para secuestrar constituyentes citoplásmicos^{4,58}. Posteriormente, los extremos de esta membrana se fusionan para formar una estructura de doble membrana denominada **autofagosoma**. El autofagosoma se fusiona con los lisosomas (**autolisosoma**) y el contenido citoplásmico atrapado junto con la membrana interna del autofagosoma es degradado por las enzimas hidrolíticas del lisosoma⁵⁸ (Figura 3).

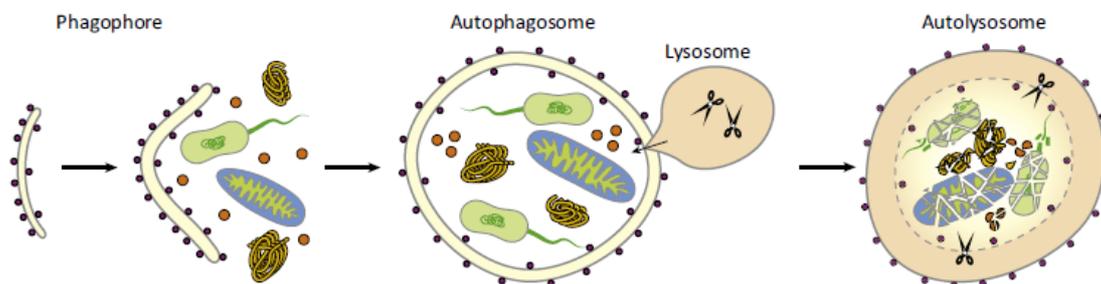


Figura 3. Representación esquemática del mecanismo de macroautofagia (Tomada de Khaminets *et al.*, 2016).

1.2.4. Maquinaria Central de la Macroautofagia

Las etapas que ocurren durante el proceso de la macroautofagia son complejos y aún falta mucho por entender, sin embargo, para su comprensión la macroautofagia se divide en cuatro etapas^{4,59} (Figura 4):

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 RB1CC1. 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 4). Sin embargo, durante un estrés celular y metabólico (por ejemplo, disminución de nutrientes) mTORC1 se inactiva y se disocia del complejo ULK, permitiendo la defosforilación en sitios represores y autofosforilación de ULK en

sitios de activación que le permiten fosforilar y activar a RB1CC1. 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 4), el cual es considerado uno de los principales organelos que contribuyen a la formación del autofagosoma.

2. Nucleación. Una vez liberado el complejo PI3KC3, este 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 4).

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 pro-LC3, el cual es constitutivamente cortado por la proteasa de cisteína ATG4) se une covalentemente a fosfatidiletanolamina (PE) en la superficie de la membrana del fagóforo, 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 4). LC3-II se queda anclado en la membrana de los autofagosomas y por lo tanto es comúnmente utilizado como marcador de la formación de autofagosomas. Una vez completada la formación del autofagosoma, ATG4 remueve a LC3-II de la membrana externa autofagosomal (proceso llamado desconjugación) reconstituyendo a LC3-I y permitiendo la fusión del autofagosoma con el lisosoma; la fracción de LC3-II que quedó asociada con la membrana interna del autofagosoma, se degrada por las hidrolasas lisosomales. La maduración de pro-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 multimerización 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 través de microtúbulos 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 RAB, HOPS, SNAREs, entre otras (Wirawan *et al.*, 2012). Una vez dentro del lisosoma, el contenido es degradado por hidrolasas lisosomales. 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^{60,61}. De esta manera la autofagia participa en diversas funciones.

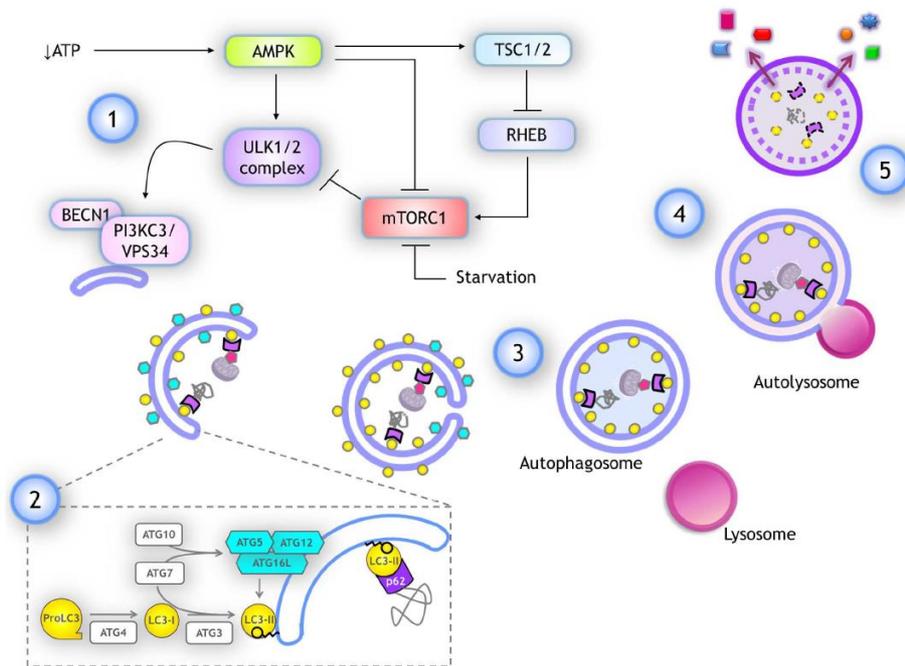


Figura 4. Maquinaria Central de la macroautofagia (tomada de Acevo-Rodríguez *et al.*, 2020). Ver el texto para los detalles.

1.2.5. 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 mejoren⁶². Sin embargo, se han descrito una gran variedad de funciones adicionales para la autofagia, ya que interviene en la proliferación, crecimiento, diferenciación y muerte celular^{4,6,63}. 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^{64,65}. 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 las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington⁶⁶, así como en la progresión del cáncer, en el proceso de envejecimiento y en la senescencia celular^{7,8,62,65,67}.

La disminución del flujo autofágico en distintos tejidos está asociada con el envejecimiento, mientras que su estimulación puede tener potentes efectos antienvjecimiento⁸. En este sentido, una de las consecuencias más inminentes de la

deficiente degradación autofágica está relacionada con la acumulación de “desechos celulares” (estructuras dañadas) dentro de células postmitóticas de larga vida como neuronas y fibras del músculo esquelético⁷. Esta acumulación de desperdicios (agregados de proteínas y organelos dañados) resulta en un aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS), daño al DNA y defectos en procesos biológicos, lo cual eventualmente afecta la funcionalidad autofágica/lisosomal y da lugar a un círculo vicioso pro-envejecimiento⁷.

1.3. Autofagia y Senescencia Celular

Está bien documentado que el proceso autofágico está asociado a la senescencia celular⁶⁸. Por un lado, Kang y su grupo (2011) usando RNAs de interferencia para silenciar a los genes *ATG7*, *ATG12* Y *LAMP2* en fibroblastos diploides humanos (HDF), observaron que dicho silenciamiento 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 fenotipo senescente. Estos resultados sugieren que la inhibición de la autofagia induce senescencia celular en fibroblastos de humano (Kang *et al.*, 2011).

Por otro lado, Young y col. (2011) reportaron un incremento en la actividad autofágica en un modelo de senescencia inducido por la expresión del oncogén Ras (RIS, del inglés *Ras-induced senescence*). En comparación con células control no senescentes, observaron acumulación de autofagosomas en células senescentes inducidas por Ras. Además, usando una tinción conocida como lysoTracker, marcaron los compartimentos lisosomales y encontraron que la señal de LC3 colocaliza con los lisosomas, sugiriendo la formación de autolisosomas. Adicional a esto, silenciaron a los genes *Atg5* y *Atg7* (genes esenciales para la formación de autofagosomas) usando RNAs de interferencia. Este grupo encontró 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.

En resumen, es necesario estudiar el papel de la autofagia en la senescencia celular. Si bien la actividad de la autofagia mediada por chaperonas también disminuye con el envejecimiento, su contribución en el establecimiento de la senescencia celular está poco estudiada. Sin embargo, una revisión crítica de la literatura nos permitió proponer que la pérdida de la función de la autofagia mediada por chaperonas también promueve la senescencia celular⁶⁹. En el anexo 5 se presenta la revisión.

2. Antecedentes

2.1. Senescencia Neuronal y Autofagia

Casi 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)⁷⁰ o a partir de fibroblastos en cultivo⁷¹. Sin embargo ¿Qué se sabe de la senescencia en células post-mitóticas, particularmente en neuronas? Generalmente se había descartado la presencia del fenotipo senescente en células post-mitóticas, debido a que una de las características de las células senescentes es el bloqueo

permanente de la proliferación¹³. No obstante, recientemente se demostró por primera vez que neuronas corticales y neuronas de Purkinje de ratones viejos (32 meses de edad) expresan varios marcadores de senescencia como son: actividad SA- β -gal, expresión de IL6, p38 fosforilada (p-p38), autofluorescencia (indicativo de acumulación de lipofuscina), γ H2AX, entre otros, concluyendo que las neuronas también expresan un fenotipo senescente, similar al que presentan las células mitóticas⁷². Además, este mismo grupo observó que la restricción de nutrientes en los ratones viejos redujo significativamente el número de neuronas de Purkinje positivas a los marcadores de senescencia (actividad SA- β -Gal, IL6, p-p38, autofluorescencia, γ H2AX)⁷². Esto nos hace suponer que la autofagia podría influir en la adquisición del fenotipo senescente en neuronas.

Sin embargo, se desconoce si las neuronas senescentes también desarrollan un fenotipo secretor (SASP neuronal). Menos aún se conoce si se altera la autofagia durante la senescencia neuronal y si participa en el establecimiento de dicho fenotipo. Una desventaja de estudiar animales viejos, además de que necesitan mantenerse por muchos meses en el bioterio bajo condiciones controladas para después ser estudiados, es que se complica analizar los mecanismos moleculares que participan *in vivo*. De acuerdo con lo anterior, varios grupos han observado distintas características del fenotipo senescente en cultivos primarios de neuronas derivados de modelos murinos y mantenidos *in vitro* por largo tiempo¹⁵.

En modelos de cultivo de neuronas de 25 a 30 DIV, se ha reportado una elevada actividad de SA- β -gal, aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), altos niveles de p21^{CIP/WAF1}, focos de la histona fosforilada γ H2A.X. y aumento de la interleucina-6 (IL-6)⁷³⁻⁷⁸. Estos datos sugieren que neuronas cultivadas *in vitro* por periodos prolongados de tiempo pueden modelar la senescencia neuronal que ocurre *in vivo* en cerebros viejos¹⁵. Además de las características senescentes, las neuronas mantenidas *in vitro* por largo tiempo presentan alteraciones fenotípicas adicionales como por ejemplo, alteraciones en la homeostasis de calcio⁷⁹, disfunción mitocondrial⁷⁶ y reducida actividad de la maquinaria de reparación del DNA⁷³, las cuales están muy relacionadas con el fenotipo senescente.

Con base en estos antecedentes, en nuestro laboratorio nos enfocamos en desarrollar un modelo de senescencia neuronal *in vitro* en cultivos primarios de corteza de rata que reproduce las características descritas en cerebros viejos. Este modelo permite observar y manipular la autofagia para estudiar su papel en el proceso de senescencia celular.

3. Justificación

Este trabajo contribuirá al conocimiento de las bases moleculares de la senescencia neuronal. Si demostramos que ocurren cambios en la autofagia que contribuyen al establecimiento del fenotipo senescente, se podría tratar de corregir dichos cambios, con la expectativa de revertir el fenotipo senescente y detener el deterioro cerebral.

4. Hipótesis

Durante el envejecimiento neuronal ocurre una deficiente actividad autofágica que promueve el establecimiento del fenotipo senescente, el cual puede ser disminuido al promover la actividad autofágica.

5. Objetivos

1. Desarrollar un modelo de senescencia neuronal *in vitro* que nos permita investigar las bases moleculares de la senescencia neuronal.
2. Analizar el papel de la autofagia en el establecimiento de la senescencia neuronal *in vitro*.

6. Material y Métodos

6.1. Cultivo de neuronas corticales 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 sembraron a una densidad de 1.05×10^5 células/cm² en cajas de 12 pozos sobre cubreobjetos para realizar inmunofluorescencia y en cajas Petri de 10 cm para Western blot. Las cajas de cultivo y los cubreobjetos 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(50X) 2% (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. El medio de cultivo contiene los requerimientos necesarios para la viabilidad y el mantenimiento de las neuronas en cultivo sin la necesidad de tener una capa de astrocitos. 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. Viabilidad celular

La viabilidad celular fue estimada por tinción con LIVE/DEAD viability/cytotoxicity kit (INVITROGEN/GIBCO, Grand Island, NY, USA). Las células vivas se tiñeron con calceína, mientras que las células muertas fueron teñidas con homodímero de etidio, siguiendo las instrucciones del fabricante. Solo se cuantificaron las células con morfología nuclear sana (núcleos no apoptóticos).

6.4. 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 °C⁸⁰ 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.

6.5. 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).

6.5.1 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. 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 h) 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. La lista completa de anticuerpos primarios y secundarios y el protocolo completo se detallan en el Anexo 3.

6.7. Detección de autofagosomas con Cyto ID kit (ENZ-51031:K200) y tinción con LysoTracker

Este protocolo se realizó en 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. Las células se incubaron con LysoTracker (DND-99 LIFE TECHNOLOGIES, Oregon, USA) por 20 min a 37 °C, 5% de CO₂ y después se observaron en un microscopio de epifluorescencia Nikon ECLIPSE Ti-U.

6.8. Obtención de medio condicionado

Para el cultivo de tejido cortical con medio de cultivo senescente, se realizó una dilución de 750 µl de medio senescente más 250 µl de medio fresco (relación 3:1).

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.

6.9. 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 quedara a una concentración final de Spautin-1 de 2µM en 1 ml de medio neurobasal. Se removieron 500 µl de medio de cada pozo y se agregaron 500 µl 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.

6.10. Western blot

Las células fueron sembradas en presencia o ausencia de cloroquina [20 µM] (C-6628 SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA) por 4 h. 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 30 µg de muestra para los ensayos de electroforesis en geles de acrilamida en condiciones desnaturizantes. Los geles fueron transferidos utilizando membranas de PVDF-FL (Millipore). Las membranas se bloquearon con TTBS (Trizma 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, Tween 0.1 %) en leche Biorad 5% durante 1 h. Se incubaron durante toda la noche con el anticuerpo primario a 4°C, rabbit anti-LC3 (1:1000, MBL PD014, Nagoya, Japan), rabbit anti-p62 (1:500, CELL SIGNALING 5114S, Beverly, MA, USA), mouse anti-TUBULIN (1:10000, CELL SIGNALING 3873, Beverly, MA, USA). Se realizaron 3 lavados con TTBS de 10 min cada uno y se incubaron con el anticuerpo secundario IRDye® 680RD goat anti-rabbit (925-68071, LI-COR) o IRDye® 800CW goat anti-mouse (925-32210, LI-COR) anti-conejo usando una dilución 1:10000 en TTBS. Las membranas se revelaron en el equipo Odyssey® IR scanner y las imágenes se analizaron con el Odyssey® Image Studio software 5.2.5.

6.11. Microscopía electrónica

Las células corticales se fijaron en glutaraldehído 3%. Después, se llevó a cabo la deshidratación de las muestras con un gradiente de etanol: 30-40-50-60-70-80-90-100 % a 4°C. Luego, las células se embebieron en la resina LR White y la polimerización se llevó a cabo a 50 °C. Se cortaron secciones ultradelgadas de 70-80 nm usando un

Ultracut-Recheirt-Jung y los cortes se colocaron en gradillas de níquel para el posterior ensayo de inmunogold.

Se lavaron las muestras con agua desionizada dos veces y otras dos veces con PBS/tween20 0.005%. Después, se incubaron las muestras por 30 min con solución de bloqueo (50 mM glycine, 0.005 % Tween20, 0.01 % Triton X-100 and 0.1 % BSA en PBS)⁸¹. Después del bloqueo, las secciones se incubaron con el anticuerpo primario: rabbit anti-LC3 (1:500, MBL PD014, Nagoya, Japan). Las secciones se lavaron 3 veces con PBS/tween20 0.005% y se incubaron toda la noche a 4 °C con el anticuerpo secundario: donkey anti-rabbit 25-nm gold conjugate (Electron Microscopy Science Aurion #25708) diluido en 25 mM de glicina, 0.005 % Tween20 y 0.01 % Triton X-100 en PBS. Las muestras se lavaron 3 veces con PBS/Tween 20 0.005% y se post-fijaron en PBS/glutaraldehído 2% por 10 min. Después, se lavaron con agua destilada por 5 min y contra-tiñeron con acetato de uranilo 2%, se lavaron con agua, se secaron y se observaron en el microscopio JEOL JEM 1200 EXII electron microscope.

6.12. Análisis de expresión genética

El RNA total se extrajo utilizando TRIzol™ reagent (Life Technologies), y se sintetizó cDNA a partir de 1 µg of RNA usando el High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific #4368814). La reacción de PCR cuantitativa (qPCR) se realizó con SYBR green mix (Kapa SYBR® Fast Universal #KK4602) usando el equipo Rotor-Gene Qthermocycler (Qiagene, Germantown, MD, USA). Todas las reacciones se realizaron por cuadruplicado y la expresión fue normalizada usando el mRNA de glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*). Las secuencias de los oligos usados fueron las siguientes:

Cdkn1a F 5' -CCGAGAACGGTGGAACTTTGAC-3' ;
Cdkn1a R 5' -GAACACGCTCCCAGACGTAGTTG-3'
Ccl2 (Mcp-1) F, 5' - ATGCAGTTAATGCCCCACTC;
Ccl2 (Mcp-1) R, 5' -TTCCTTATTGGGGTCAGCAC-3'
Gapdh F, 5' -CTCATGACCACAGTCCATGC-3'
Gapdh R, 5' -TTCAGCTCTGGGATGACCTT-3'

6.13. Ensayo cometa

Las células fueron resuspendidas en PBS frío a una densidad de 103 células/µL. Esta suspensión se mezcló en una proporción 1:5 con 0.75% de agarosa de bajo punto de fusión (BIO RAD Certified™ Low Melt Agarose #1613111, Hercules, California, USA) a 37°C. Se colocaron aproximadamente de 50-100 µL de la mezcla en laminillas recubiertas con 1% de agarosa de punto de fusión normal, se distribuyó la mezcla colocando el cubreobjetos y se incubó a 4° C por 2 min y 10 min más a temperatura ambiente. Se retiró el cubreobjetos y las laminillas se cubrieron con solución de lisis previamente enfriada (0.03 M EDTA, 1% SDS) y se incubó a 4°C por 1 h. Después, se lavaron las laminillas y se cubrieron con buffer de electroforesis (Tris 60 mM, acetic acid 90 mM, EDTA 2.5 mM, pH 9.0) durante 1 h. La electroforesis se llevó a cabo a 25 V por 20 min. Inmediatamente los portaobjetos se enjuagaron y se incubaron por 10 min en buffer de neutralización (Tris-HCl 500 mM, pH 7.5) 3 veces. Finalmente, el DNA fue teñido con SYBR green (SYBRTM green I Nucleic Acid Gel Stain, INVITROGENTM, Eugene, Oregon, USA) 1:10000 en PBS. Para cada grupo se

cuantificaron 50 imágenes de cometas usando un microscopio de epifluorescencia Nikon ECLIPSE Ti-U. La longitud y el área del DNA roto se cuantificó usando el NIS Elements Basic Research software (NIKON INSTRUMENTS Inc ®, NY, USA).

6.14. Análisis del SASP de células corticales

Medio condicionado fue colectado de cultivos corticales de 6, 26 y 40 días *in vitro* (DIV) y congelado a -20 °C hasta su uso. El medio condicionado se concentró usando las unidades de filtración Amicon Ultracel-3 kDa (Millipore # UFC800324) y un total de 50 µL del medio condicionado concentrado fue usado para medir la concentración (pg/mL) de G-CSF, GM-CSF, IFN gamma, IL-1 α , IL-1 β , IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, TNF alpha, Eotaxin, Gro α , IP-10, MCP-1, MCP-3, MIP-1 α , MIP-2 y RANTES usando el ProcartaPlex® Multiplex Immunoassay (BIO RAD # 171K1002M). Los datos se obtuvieron usando el analizador Luminex Instrument y la concentración de los analitos fue medida calibrando con una curva estándar para cada citocina proporcionada por el fabricante.

6.15. Análisis estadísticos

Todos los datos fueron analizados y graficados usando Prism 6 (GraphPad Software Inc. La Jolla, CA, USA). Se realizaron pruebas específicas para cada diseño experimental y se indican en cada figura.

7. Resultados

7.1. Las neuronas corticales mantenidas *in vitro* por largo tiempo adquieren características senescentes

Para establecer el modelo de senescencia neuronal *in vitro* se realizaron cultivos primarios de células corticales de ratas Wistar, que fueron mantenidos en cultivo hasta 40 días *in vitro* (40 DIV). Durante los primeros días del cultivo (6 DIV), las neuronas (positivas a β III-TUBULIN) representaron el 96.8 % de las células con muy poca presencia de células gliales (positivas a GFAP); debido a la proliferación de las células gliales (a pesar de que el medio de cultivo no contiene suero) y a la muerte de neuronas, a los 26 DIV, hubo 51 % de neuronas y 31 % de glía; y a los 40 DIV, 73% de las células sobrevivientes fueron glía (Figura 5). Experimentos futuros serán necesarios para determinar específicamente el tipo de muerte celular (ya sea apoptosis, necroptosis u otro tipo de muerte) que sufren las neuronas cultivadas en estas condiciones y a los tiempos indicados. Por otro lado, sin algún tipo de estímulo estresante adicional, se detectó señal de la actividad SA- β -gal y acumulación de lipofuscina, detectada por autofluorescencia y por tinción con Sudan Black B (SBB), un colorante lipofílico²⁶ en las células corticales desde los 26 DIV (Figura 6).

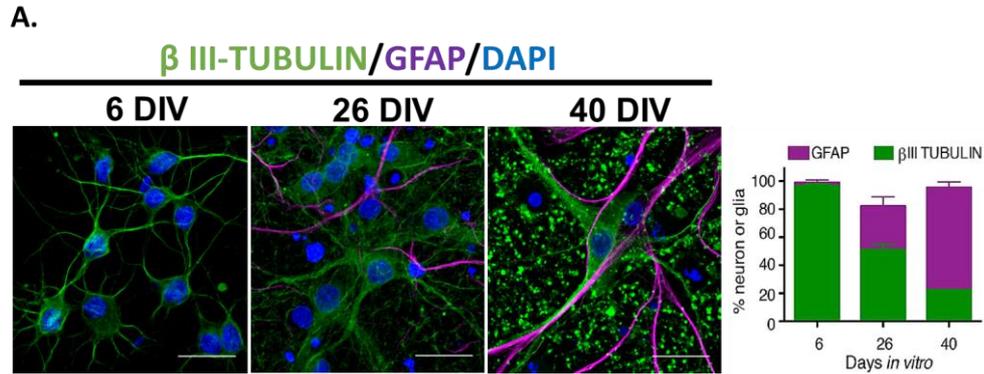


Figura 5. Cultivo primario de corteza es viable hasta 40 días *in vitro*. Inmunofluorescencia usada para cuantificar neuronas (β III-TUBULIN) y células gliales (GFAP) a los 6, 26 y 40 DIV. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. La barra de escala representa 25 μ m. La gráfica representa el porcentaje de neuronas o células gliales a lo largo del cultivo. La barra representa SEM, n=3. (Tomado de Moreno-Blas *et al.*, 2019⁸²).

Otra de las características de la senescencia celular es la presencia de daño en el DNA, comúnmente detectada por focos de la variante de histonas γ H2A.X. Como se muestra en la figura 7, el cultivo presenta un mayor número de neuronas con focos de γ H2A.X a los 26 DIV (Figura 7A y B), así como un incremento de rupturas en el DNA, detectadas por ensayo cometa (Figura 7C y D). Aunque no es posible distinguir entre neuronas y glía con el ensayo cometa, pensamos que los núcleos con DNA roto pertenecen a neuronas, ya que observamos que principalmente las neuronas muestran los focos de γ H2A.X. Estos resultados sugieren que las neuronas acumulan daño en el DNA a lo largo del tiempo de cultivo lo cual podría asociarse a un mayor daño en el DNA. Tanto a los 26 como a los 40 DIV, solo una pequeña proporción de células gliales (GFAP positivas) presentaron focos de γ H2A.X (Figura 7B). Esta observación sugiere que las neuronas adquieren características senescentes antes que las células gliales.

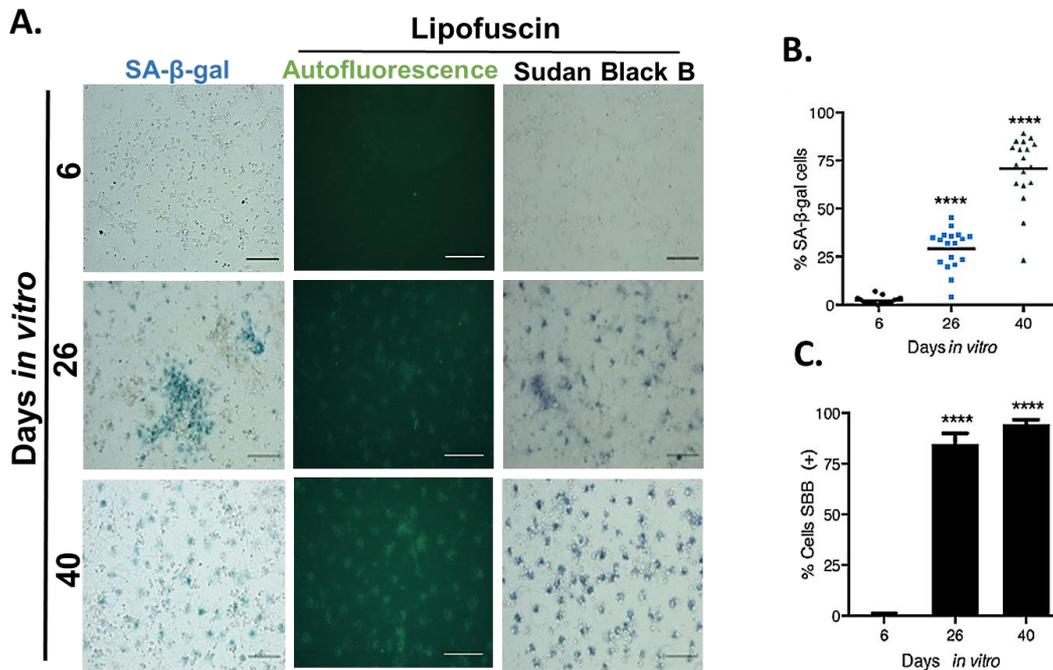


Figura 6. Células corticales cultivadas por largo tiempo muestran elevada actividad SA- β -gal y acumulación de lipofuscina. (A) La actividad SA- β -gal y la acumulación de lipofuscina detectada por autofluorescencia o tinción con Sudán Black B (SBB) fueron analizadas en el cultivo primario de células corticales de rata a los días *in vitro* indicados. La barra de escala representa 100 μ m. (B-C) Porcentaje de células positivas a SA- β -gal o SBB en células corticales

incubadas a los días *in vitro* indicados. Las barras en las gráficas representan SEM, n=3. Two-way RM ANOVA analysis, seguido de la prueba de comparación múltiple Dunnett. **** p< 0.0001 en comparación con 6 DIV. (Tomado de Moreno-Blas *et al.*, 2019⁸²).

La persistente activación de la respuesta al daño en el DNA induce la fosforilación de p53, lo cual aumenta la posibilidad de que esta proteína active la transcripción de varios genes, entre ellos p21^{CIP1/WAF1} 116. De hecho, se ha reportado a p21^{CIP1/WAF1} como un regulador clave de la senescencia neuronal en cerebros de ratones viejos⁷². Por esta razón, decidimos analizar su expresión a los diferentes tiempos del cultivo. Como se muestra en la figura 3, las neuronas de 26 DIV, pero no la glía, expresaron altos niveles de p21^{CIP1/WAF1}. El número de células gliales con elevada expresión de p21^{CIP1/WAF1} aumentó hasta los 40 DIV (Figura 7F). Interesantemente la señal de p21^{CIP1/WAF1} a los 26 DIV está ligeramente enriquecida en la periferia nuclear, lo cual podría estar relacionado con los recientes trabajos donde proponen al transporte nuclear alterado como una característica del envejecimiento y de la senescencia celular⁸³. También confirmamos que la expresión de p21^{CIP1/WAF1} es inducida a nivel transcripcional en células corticales a los 26 DIV por qRT-PCR (Figura 7G).

El fenotipo senescente también está caracterizado por la pérdida de la expresión de proteínas de la envoltura nuclear, que resulta en una alterada morfología nuclear²⁷. Por lo tanto, nos preguntamos si las neuronas senescentes también muestran deformaciones nucleares. Como se muestra en la Figura 8, las neuronas senescentes de 26 DIV muestran una morfología nuclear irregular con pliegues de la envoltura nuclear formando estructuras intranucleares de lamina A/C que invaginan hacia el nucleoplasma. Muy pocos astrocitos mostraron una distribución anormal de lamina A/C a los 26 DIV, fortaleciendo la idea de que las neuronas se vuelven senescentes antes que las células gliales en este modelo.

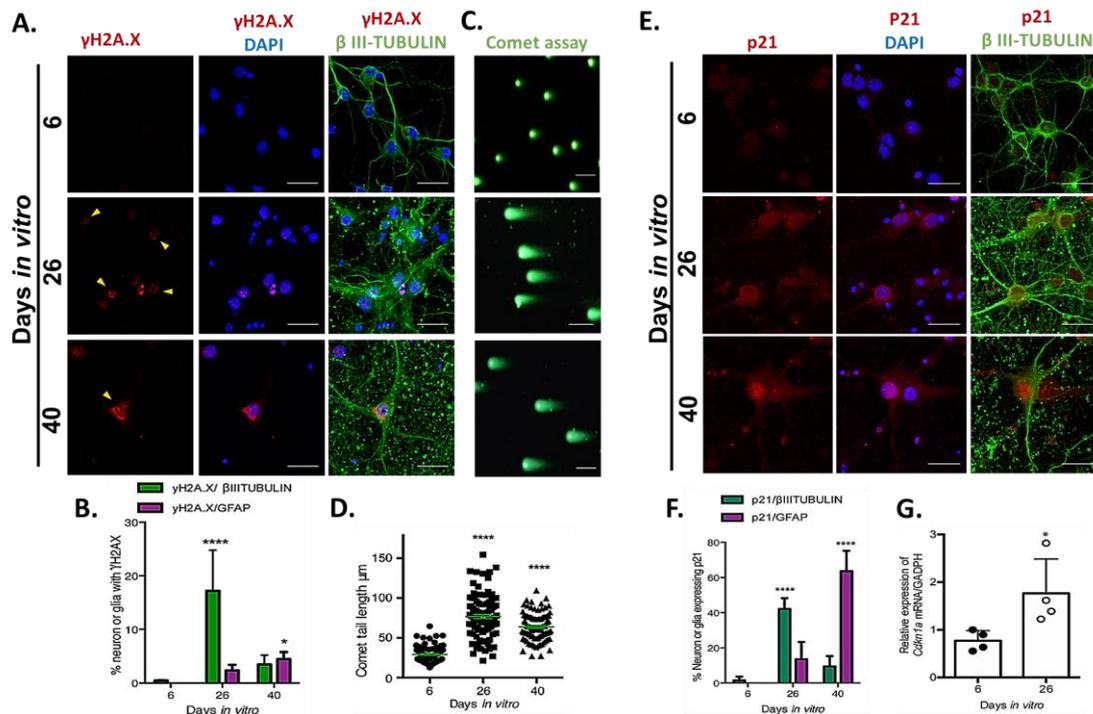


Figura 7. Células corticales cultivadas por largo tiempo muestran daño en el DNA y elevada expresión de p21^{CIP1/WAF1}. (A) Inmunofluorescencia para detectar focos de γ H2A.X en neuronas (β III-TUBULIN) incubadas a los días *in vitro* indicados. Las flechas indican neuronas positivas a focos de γ H2A.X. La barra

de escala representa 25 μm . (B) Cuantificación del porcentaje de neuronas o células gliales (GFAP) con focos de $\gamma\text{H2A.X}$ a lo largo del cultivo. Las barras en las gráficas representan SEM, $n=3$. Análisis de RM ANOVA de dos vías, seguido de la prueba de comparación múltiple Dunnett's. **** $p < 0.0001$ 26 DIV vs. 6 DIV; * $p < 0.05$ 40 DIV vs. 6 DIV. (C) Ensayo cometa usado para detectar rupturas de doble cadena de DNA de células colectadas a los días indicados. La barra de escala representa 100 μm . (D) Gráfica de la longitud de las colas de los cometas, como indicativo del nivel de daño en el DNA, se contaron 50 núcleos por cada grupo y fueron analizados con RM one-way ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple Dunnett. **** $p < 0.0001$ entre 26 DIV o 40 DIV en comparación con 6 DIV. (E) Inmunofluorescencia para detectar $p21^{\text{CIP1/WAF1}}$ en neuronas ($\beta\text{III-TUBULIN}$) incubadas a los días *in vitro* indicados. La barra de escala representa 25 μm . (F) Porcentaje de neuronas o células gliales expresando $p21^{\text{CIP1/WAF1}}$ a lo largo del cultivo. Las barras en las gráficas representan SD, $n=3$. Two-way RM ANOVA analysis, seguido de la prueba de comparación múltiple Tukey. **** $p < 0.0001$. (G) qRT-PCR de RNA total purificado del cultivo primario cortical durante los días indicados. La expresión relativa de mRNA de *Cdkn1a* fue normalizada con mRNA de *Gapdh*. Las barras en las gráficas representan SD. * $p=0.039$ by unpaired t test two tailed. $n=4$. (Tomado de Moreno-Blas *et al.*, 2019⁸²).

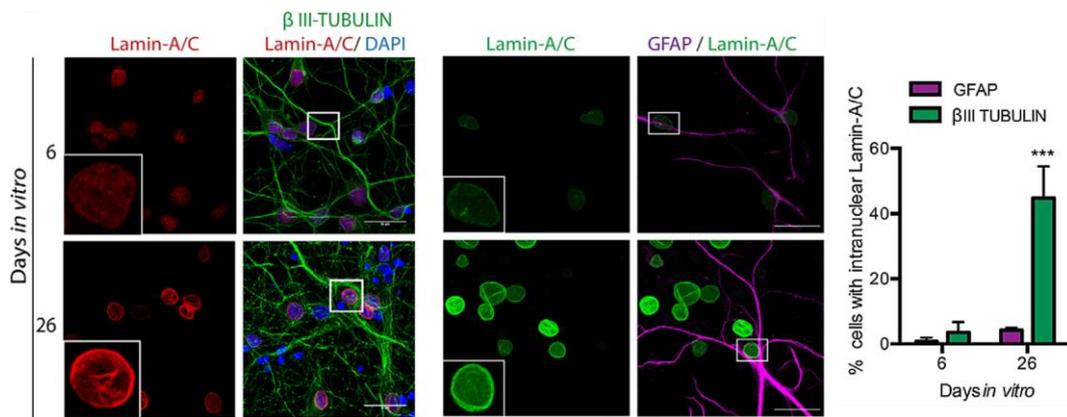


Figura 8. Las células corticales cultivadas durante un largo tiempo presentan defectos en la morfología nuclear. Inmunofluorescencia para detectar Lamin A/C en neuronas ($\beta\text{III-TUBULIN}$) o astrocitos (GFAP) en cultivo primario de células corticales incubadas durante los días *in vitro* indicados. La barra de escala representa 25 μm . La gráfica representa el porcentaje de neuronas o astrocitos con morfología nuclear aberrante. Las barras en las gráficas representan SEM, $n=3$; two-way RM ANOVA analysis, *** $p < 0.001$ en comparación con 6 DIV. (Tomado de Moreno-Blas *et al.*, 2019⁸²).

7.2. Las neuronas corticales senescentes desarrollan un fenotipo secretor (SASP neuronal)

Para determinar si las neuronas senescentes presentan un fenotipo secretor asociado a senescencia, primero analizamos la expresión de GATA4, uno de los principales factores de transcripción que promueve la expresión de moléculas del SASP⁸⁴. Como se muestra en la Figura 9A-B, GATA4 se acumuló en neuronas cultivadas por 26 DIV, sugiriendo la presencia de un SASP neuronal. Vale la pena notar el enriquecimiento de GATA4 en la periferia nuclear, semejante al patrón de localización de $p21^{\text{CIP1/WAF1}}$.

Para tener una idea de las citocinas que las células corticales senescentes podrían estar secretando, colectamos el medio condicionado del cultivo de 6, 26 y 40 DIV y analizamos la presencia de las citocinas $\text{IFN}\gamma$, $\text{IL-1}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-10 , IL-12p70 , IL-13 , IL-17A , IL-2 , IL-4 , IL-5 , IL-6 , $\text{TNF}\alpha$, de las quimiocinas EOTAXIN, MCP-1, MCP-3, MIP-1 α , MIP-2, GRO- α , IP-10, RANTES y de los factores de crecimiento G-CSF, GM-CSF. Solamente MCP-1, RANTES, MIP-2, GRO-1, MCP-3 y EOTAXIN fueron más abundantes en los medios condicionados de los cultivos corticales senescentes, aunque únicamente MCP-1 mostró diferencia estadísticamente significativa a los 26 y 40 DIV

comparado con el cultivo de 6 DIV (Figura 9C). Los demás factores no fueron detectados en el medio condicionado de ninguno de los grupos.

Para corroborar si existía un incremento en la expresión de MCP1, evaluamos por qRT-PCR la expresión del gen *Ccl2* (gen que codifica a MCP-1) en células corticales senescentes a los 26 y 40 DIV, y observamos un aumento significativo a nivel de mRNA (Figura 9D). Ya que se ha demostrado que MCP-1 induce senescencia paracrina⁸⁵ y GATA4 regula la expresión de MCP-1 durante la senescencia inducida por defectos en la Lamin A⁸⁶, pensamos que las neuronas senescentes podrían adquirir un SASP funcional. Así que, para probar esta hipótesis, analizamos si el medio condicionado de células corticales senescentes podría inducir senescencia paracrina. Para ello, el medio condicionado de 6, 26 y 40 días de cultivo fue colectado y adicionado a células corticales jóvenes de 1 DIV y después de 6 DIV de tratamiento, varios de los marcadores de senescencia descritos anteriormente fueron evaluados (se presenta un esquema del diseño experimental en la figura 9E). Sin embargo, no observamos expresión significativa en alguno de los marcadores de senescencia en neuronas jóvenes. Esta observación nos lleva a proponer que las neuronas podrían ser más resistentes a la senescencia paracrina que las células mitóticas.

Interesantemente el medio condicionado de células corticales cultivadas por 26 y 40 DIV indujo abundante proliferación de células gliales (Figura 5F-G) sugiriendo que las neuronas senescentes podrían afectar la organización del tejido. Adicionalmente, en nuestro grupo se encontró que el medio condicionado de neuronas senescentes induce senescencia paracrina en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) (Alexander Pommer, tesis de maestría), apoyando la idea de que las neuronas senescentes desarrollan un SASP funcional capaz de inducir proliferación glial y senescencia paracrina en otros tipos celulares.

En conjunto, nuestros resultados confirman que en nuestro modelo *in vitro* las neuronas adquieren características senescentes, incluyendo un SASP funcional, antes que las células gliales. Esto sugiere que las neuronas podrían afectar la función de células circundantes, tales como los astrocitos y afectar la función del cerebro durante el envejecimiento.

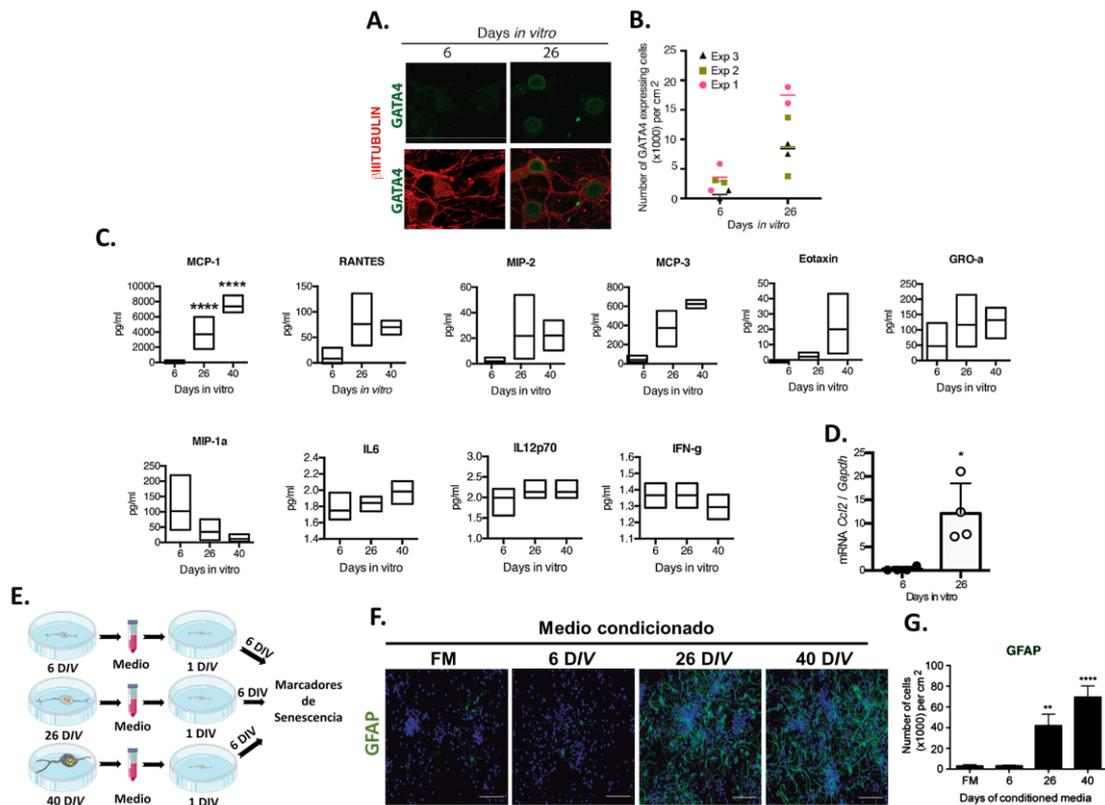


Figura 9. Neuronas senescentes incrementan la expresión de GATA4 y desarrollan un SASP neuronal. (A) Inmunofluorescencia para detectar GATA4 en neuronas (β III-TUBULIN) en cultivo primario de células corticales incubadas durante los días *in vitro* indicados. (A) La gráfica representa el número de neuronas con elevada expresión de GATA4, $n=3$, cada uno realizado por duplicado. La barra horizontal de la gráfica representa el promedio. (C) Cuantificación de las citocinas y quimiocinas indicadas en los medios condicionados del cultivo primario de 6, 26 y 40 DIV. Se gráfica el valor máximo y mínimo, la barra representa el promedio de tres experimentos independientes. Los datos fueron analizados con two-way ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple Tukey, **** $p<0.0001$ en comparación con 6 DIV. (D) qRT-PCR de RNA total purificado del cultivo primario cortical durante los días indicados. La expresión relativa de mRNA de *Ccl2* fue normalizada con mRNA de *Gapdh*. Las barras en las gráficas representan SD. * $p=0.0106$ by unpaired t test two tailed. $n=4$. (E) Diseño Experimental para evaluar la presencia de moléculas secretadas por las células corticales senescentes. El medio condicionado fue colectado de células corticales de 6, 26 y 40 DIV. Células corticales de 1 DIV fueron cultivadas por 24 h antes de agregar el medio condicionado; los marcadores de senescencia fueron evaluados 6 días después. (F) Inmunofluorescencia para detectar GFAP en células corticales. Las células fueron incubadas con medio condicionado colectado de células corticales que había sido incubado durante los días *in vitro* indicados. FM= medio fresco. La barra de escala representa 500 μm . (G) La gráfica representa la cuantificación del número de células expresando GFAP en tres experimentos independientes. Los datos fueron analizados con one-way ANOVA, seguido de la prueba de comparación múltiple Dunnett. ** $p<0.01$; **** $p<0.0001$ comparado con FM. (Tomado de Moreno-Blas *et al.*, 2019⁸²).

7.3. Las alteraciones en el flujo autofágico contribuyen al desarrollo del fenotipo senescente en neuronas corticales

Considerando la abundante evidencia que demuestra que el envejecimiento, la neurodegeneración y la senescencia celular son procesos biológicos caracterizados por defectos en la autofagia, nos preguntamos si la disfunción autofágica contribuiría al establecimiento de la senescencia neuronal en nuestro modelo. Por ello, analizamos primero si las neuronas presentan un flujo autofágico reducido, reflejado por la acumulación de autofagosomas y proteínas relacionadas a estas vesículas, como LC3 y p62/SQSTM1. Como se muestra en la Figura 10A, las células corticales de 26 DIV, tiempo en el que las neuronas muestran características senescentes, presentaron también una mayor cantidad de autofagosomas detectados por una tinción específica conocida

como CytoID® y por inmunofluorescencia para detectar a LC3. Además, confirmamos la acumulación de autofagosomas en neuronas senescentes por microscopía electrónica, marcándolos con inmuno-oro anti-LC3 (Figura 10A).

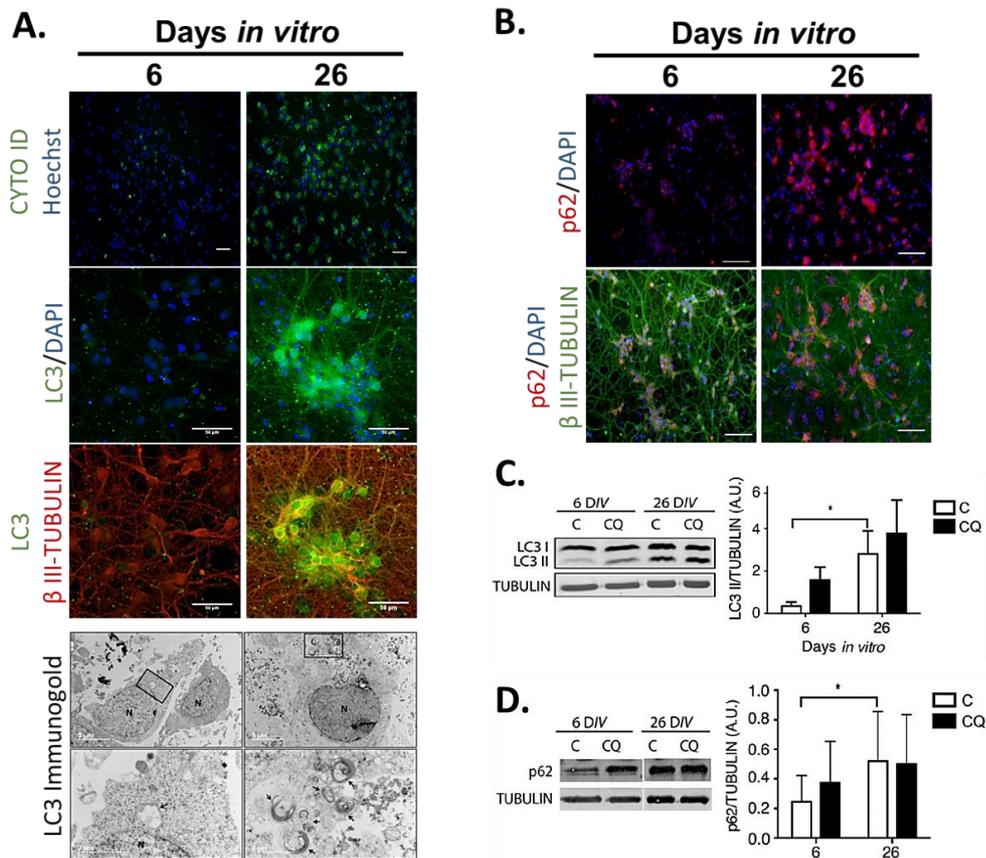


Figura 10. Deficiente degradación autofágica acompaña al proceso de senescencia neuronal. (A) Fila superior, los autofagosomas fueron teñidos con CYTO ID y los núcleos con Hoechst en el cultivo de células corticales incubadas durante los tiempos indicados. La barra de escala representa 100 μ m. Filas del medio, inmunofluorescencia para detectar LC3 en neuronas (β III-TUBULINA) en cultivo primario de células corticales incubadas durante los días *in vitro* indicados. La barra de escala representa 50 μ m. Fila inferior, micrografías electrónicas mostrando la acumulación de autofagosomas en células corticales de 26 DIV, detectados por inmuno-oro anti LC3 (flechas). (B) Inmunofluorescencia para detectar acumulación de p62/SQSTM1 en neuronas (β III-TUBULIN) durante los días *in vitro* indicados. (C-D) Western blot de extractos totales de proteína de células corticales de 6 y 26 DIV sin (C) o con cloroquina (CQ) 20 μ m por 4 h. Las gráficas representan el promedio del análisis densitométrico de 4 experimentos independientes. Las barras en las gráficas representan SEM. Two-way RM ANOVA seguido de la prueba de comparación multiple Sidak. * $p < 0.001$. (Tomado de Moreno-Blas *et al.*, 2019).

Ya que el receptor de autofagia, p62/SQSTM1 se degrada junto con el cargo, este se acumula cuando el flujo autofágico está interrumpido. Nosotros analizamos la presencia de p62/SQSTM1 por inmunofluorescencia (Figura 6B) y Western blot (Figura 10D) y encontramos que también se acumula en neuronas de 26 DIV. Estos resultados sugieren una deficiente degradación autofágica en neuronas senescentes de 26 DIV. Para verificar que la acumulación de autofagosomas se debe a un flujo autofágico alterado, incubamos a las células corticales en presencia de cloroquina (CQ), un agente que impide la fusión de los autofagosomas con los lisosomas⁸⁷. Como se muestra en la Figura 10C-D, la presencia de CQ no aumentó la cantidad de LC3-II o p62/SQSTM1 a los 26 DIV, indicando que el flujo autofágico ya se encuentra interrumpido en neuronas senescentes.

Con la finalidad de estudiar si el flujo autofágico está fallando por alteraciones en los lisosomas, analizamos su morfología, primero mediante una tinción con LysoTracker red, un compuesto fluorescente que tiñe vesículas ácidas. Como se muestra en la Figura 11A, las células de 26 DIV exhiben una señal roja fluorescente intensa y con la forma de unas vesículas de gran tamaño en contraste con el patrón punteado discreto que se observa en las células de 6 DIV. Para confirmar estos resultados, realizamos una inmunofluorescencia contra una proteína de membrana lisosomal conocida como LAMP1. Los resultados muestran la presencia de lisosomas de gran tamaño con una morfología aberrante muy cerca del núcleo de las neuronas de 26 DIV, comparado con el patrón punteado de neuronas de 6 DIV (Figura 11B). Posiblemente esta morfología lisosomal aberrante impida la fusión del autofagosoma con el lisosoma, causando el bloqueo del flujo autofágico que observamos en neuronas senescentes de 26 DIV.

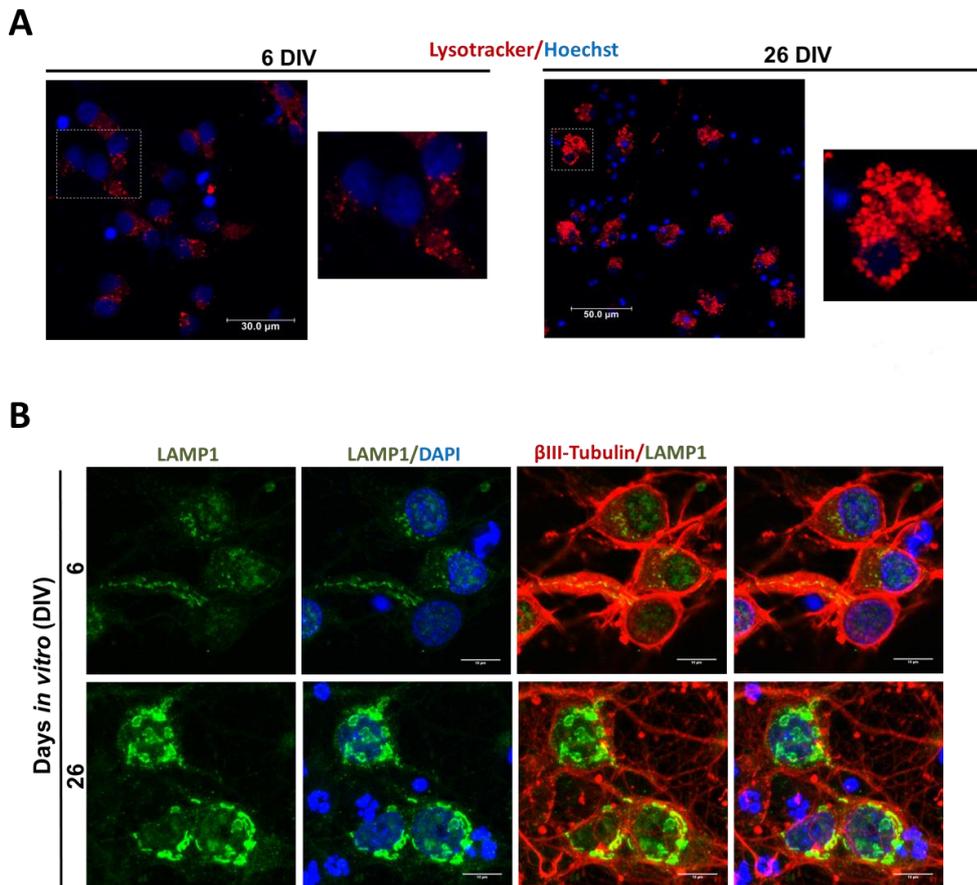


Figura 11. Morfología lisosomal aberrante en neuronas senescentes. (A) Tinción de LysoTracker para detectar lisosomas en células corticales de 6 y 26 DIV. Los núcleos se tiñeron con Hoechst. (B) Inmunofluorescencia para detectar LAMP1 en neuronas (βIII-TUBULIN) en cultivo primario de células corticales incubadas durante los días *in vitro* indicados. La barra de escala representa 25 μm.

Si defectos en la degradación autofágica contribuyen a la senescencia, entonces esperaríamos más células senescentes cuando la autofagia es inhibida. Por lo tanto, tratamos a las células corticales a distintas ventanas de tiempo (Figura 12A) con Spautin-1, un inhibidor de la formación de autofagosomas, ya que indirectamente induce la degradación de BECN1 y fosfatidilinositol-3-cinasa tipo 3/VPS34

(PI3KC3)⁸⁸. Como se muestra en la Figura 12B, encontramos que el número de células con actividad SA- β -gal aumentó cuando la autofagia fue inhibida durante la segunda o tercera semana del cultivo. Sin embargo, cuando Spautin-1 fue agregado a la 4 semana del cultivo o después, no tuvo un efecto incrementando el número de células con actividad SA- β -gal, sugiriendo que la autofagia ya se encuentra alterada a este tiempo.

Por otro lado, activando a la autofagia con trehalosa, un disacárido que mimetiza la restricción calórica evitando la ingesta de glucosa⁸⁹, redujo el número de células corticales con actividad SA- β -gal, sin importar la ventana de tiempo a la que fueron expuestas, aunque una protección más notable fue observada durante la segunda y tercera semana del cultivo (Figura 12B). Para confirmar que la inducción de autofagia con trehalosa reduce el fenotipo senescente y no solo la actividad SA- β -gal, repetimos el mismo experimento, pero ahora detectamos a la lamina A/C para evaluar si las invaginaciones nucleares fueron reducidas también. Como se muestra en la Figura 12C, la adición de trehalosa disminuyó las invaginaciones nucleares de lamina A/C. Estos resultados sugieren que la inducción de autofagia evita la conversión de senescencia y potencialmente revierte el fenotipo senescente, aunque se requiere de más experimentos para confirmar este punto.

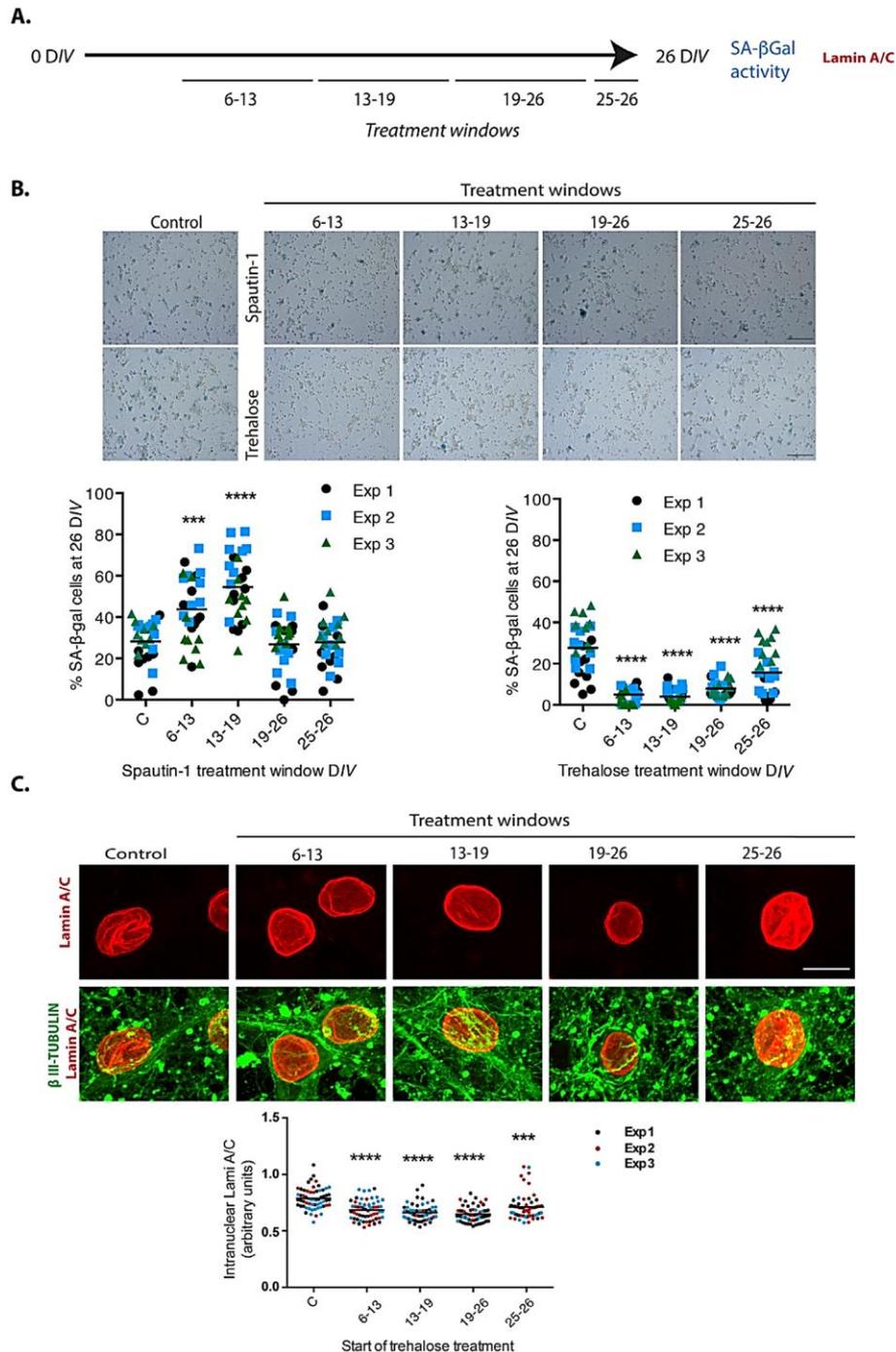


Figura 12. La modulación de la autofagia altera la senescencia de células corticales. (A) Diseño experimental. (B) Spautin-1 o trehalosa fueron añadidos durante periodos de varios días a los intervalos de tiempo de cultivo indicados. Después de 26 DIV todos los grupos (incluyendo el control sin tratamiento) fueron fijados para cuantificar el porcentaje de células con elevada actividad SA-β-gal. La barra de escala representa 500 μm. Las barras en las gráficas representan el promedio de tres experimentos independientes, hechos por triplicado cada uno. Tres campos de cada replica fueron registrados (9 campos por experimento), cada punto representa el porcentaje de células positivas a SA-β-gal por campo. Los datos fueron analizados con two-way RM ANOVA, seguido por el análisis de comparación múltiple de Dunnett's. *** $p < 0.001$ Spautin1 agregado durante los 6-13 D/V en comparación con el control; **** $p < 0.0001$ Spautin1 agregado durante los 13-19 D/V en comparación con el control y tratamientos de trehalosa en comparación con el control. (C) La trehalosa fue añadida durante los intervalos de tiempo de cultivo indicados. Después de 26 DIV todos los grupos (incluyendo el control sin tratamiento) fueron fijados para detectar la Lamin A/C por inmunofluorescencia. La barra de escala representa 5 μm. Se muestra las imágenes representativas de al menos tres experimentos independientes. Al menos 60 células por tratamiento fueron cuantificadas. Las barras en la gráfica representan el promedio. Los datos fueron analizados con two-way RM ANOVA, seguido por el análisis de comparación múltiple de Dunnett. *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ con respecto al control. (Tomado de Moreno-Blas *et al.*, 2019).

8. Discusión

Las células senescentes se acumulan con la edad en tejidos humanos y se ha descrito también en modelos murinos y su acumulación está asociada con la aparición de muchas enfermedades relacionadas con el envejecimiento¹⁴. Sin embargo, la participación de la senescencia celular en el envejecimiento cerebral es un campo de investigación que está siendo recientemente explorado. A pesar de los trabajos recientes que reportan la presencia de neuronas con características senescentes en cerebros viejos de rata y de humano^{72,84,90}, se cree que los astrocitos son el principal tipo celular del cerebro que sufre senescencia celular durante el envejecimiento⁹¹. En este trabajo hemos caracterizado un modelo *in vitro* de senescencia neuronal, útil para estudiar las bases moleculares de la senescencia celular en neuronas, así como su fenotipo secretor (SASP neuronal).

Bajo estas condiciones, demostramos que las neuronas, a pesar de ser células post-mitóticas, adquieren muchas de las características del fenotipo senescente como aumento en la actividad SA- β -gal, acumulación de lipofuscina, aumento en la expresión de p21^{CIP/WAF1}, activación de la respuesta de daño al DNA, así como deformaciones nucleares, detectadas por alteraciones en el patrón de la lamina A/C de la envoltura nuclear que le da una apariencia arrugada al núcleo de las neuronas senescentes. Este resultado es interesante, ya que dicha morfología nuclear también está presente en células senescentes en progeria^{83,92}, en senescencia replicativa y en senescencia inducida por oncogenes²⁷. Además, estas deformaciones nucleares también son observadas en neuronas de pacientes con enfermedades neurodegenerativas^{93,94} y en modelos de neurodegeneración⁹⁵, siendo las responsables de alterar el transporte núcleo-citoplasma de las neuronas, lo cual puede contribuir a la neurodegeneración. Sin embargo, aún se desconoce de qué manera las invaginaciones nucleares podrían estar participando en la senescencia neuronal. Adicional a esta característica senescente, también encontramos que las neuronas desarrollan un fenotipo secretor, capaz de afectar otras células, de lo cual no hay ningún reporte hasta el momento. En este sentido, observamos que el medio condicionado de neuronas senescentes (26 DIV) induce proliferación de células gliales. Este dato es interesante porque probablemente la proliferación de astrocitos y la astrogliosis observada comúnmente durante el envejecimiento del cerebro^{96,97} se deba en parte, a la secreción de los factores del SASP de las neuronas senescentes. Sin embargo, faltaría investigar cuales componentes del SASP neuronal son los responsables de promover dicho fenómeno. Una de las quimiocinas mayormente secretadas por las células corticales senescentes fue MCP-1. Esta proteína también fue reportada recientemente como uno de los componentes del SASP de neuronas dopaminérgicas con fenotipo senescente debido a la deficiencia de SATB1, una proteína de unión al DNA⁹⁸. MCP-1 también es secretada por células troncales mesenquimales humanas senescentes y lo proponen como el factor responsable de inducir senescencia paracrina en estas células⁹⁹. Probablemente, en nuestro modelo la secreción de MCP-1 sea uno de los componentes del SASP neuronal que está involucrado en la inducción de senescencia paracrina que observamos en MEF's tratados con medio condicionado de neuronas corticales senescentes, pero se requieren de más experimentos para probar dicha hipótesis.

En resumen, la aparición y acumulación de neuronas senescentes en el cerebro facilitaría la secreción de una gran cantidad moléculas, que podrían contribuir al desarrollo de un estado de inflamación crónica local y senescencia paracrina en células vecinas saludables como la microglía o células endoteliales, lo cual contribuiría al envejecimiento cerebral y exacerbaría la neurodegeneración.

Junto con la adquisición del fenotipo senescente en las neuronas de nuestro modelo *in vitro*, encontramos una deficiente degradación autofágica. Estos datos concuerdan con la gran cantidad de trabajos donde reportan que alteraciones en el flujo autofágico contribuyen al establecimiento de la senescencia celular^{28,71,100-103}. Sin embargo, nuestros resultados son los primeros que demuestran alteraciones en la actividad autofágica asociadas con la senescencia celular de neuronas.

El bloqueo del flujo autofágico en neuronas senescentes de 26 DIV quizá se deba a la morfología aberrante que adoptan los lisosomas de las neuronas cultivadas por largo tiempo, lo cual impide la fusión y degradación de los autofagosomas, ocasionando la acumulación de estas vesículas autofágicas. Otros grupos también han observado anormalidades similares en los lisosomas de neuronas con características senescentes^{98,104}, apoyando la idea de que la disfunción lisosomal podría ser una de las principales razones por las que se impide el flujo autofágico durante la senescencia neuronal.

Los defectos en el flujo autofágico podrían ayudar a la estabilización y acumulación de sustratos que normalmente son degradados por autofagia y que potencialmente podrían contribuir al establecimiento del fenotipo senescente. El factor de transcripción GATA4 es un ejemplo de tales sustratos. Normalmente GATA4 es degradado por autofagia, pero esta degradación se ve disminuida durante la senescencia celular, ocasionando la acumulación de este factor de transcripción que a su vez activa al factor de transcripción NF- κ B para iniciar la expresión del SASP y facilitar el proceso de senescencia celular¹⁰¹. En este sentido, nosotros también encontramos acumulación de GATA4 en neuronas senescentes, lo cual, además de ser una marca de senescencia celular y del desarrollo de un fenotipo secretor, es indicativo de una deficiente degradación autofágica. GATA4 regula la expresión de una variedad de genes, entre ellos p21^{CIP/WAF1}¹⁰⁵ y MCP-1⁸⁶, por lo tanto, el aumento en la expresión, tanto de p21^{CIP/WAF1} como de MCP-1 que observamos durante la senescencia neuronal en nuestro modelo, posiblemente se deba a la acumulación de GATA4, como resultado de un flujo autofágico defectuoso.

De acuerdo con esta idea, nosotros logramos inducir el flujo autofágico en las células corticales de nuestro modelo usando trehalosa. Dicho tratamiento redujo el número de neuronas senescentes, probablemente como resultado de la degradación de GATA4, que llevo a una menor expresión de p21^{CIP/WAF1} y MCP-1 y por consiguiente a una disminución en el número de células senescentes. No obstante, es necesario realizar experimentos para probar esta hipótesis. Apoyando esta idea, la adición de resveratrol, un conocido inductor de autofagia, también disminuyó las características senescentes en un co-cultivo de neuronas y glía mantenido *in vitro* por largo tiempo⁷⁷. Por lo tanto, los tratamientos que promuevan el flujo autofágico y/o eviten la disfunción lisosomal podrían prevenir el inicio de la senescencia neuronal.

9. Conclusión

En este trabajo caracterizamos un modelo *in vitro* útil para estudiar el proceso de senescencia neuronal y algunos de los mecanismos moleculares involucrados en su desarrollo. Demostramos que las neuronas corticales mantenidas *in vitro* por 26 días, sin algún tipo de estrés adicional, adquieren características senescentes antes que las células gliales. Además, demostramos que las células corticales senescentes desarrollan un SASP funcional que secreta componentes capaces de inducir la proliferación de células gliales. Asimismo, encontramos que el flujo autofágico se encuentra alterado durante la senescencia neuronal, contribuyendo potencialmente a mantener el fenotipo senescente en neuronas. Por lo tanto, la identificación de la autofagia disfuncional como un mecanismo clave en la senescencia neuronal es un importante primer paso para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para evitar o reducir el envejecimiento fisiológico del cerebro y la neurodegeneración.

10. Perspectivas

Los resultados de este trabajo sugieren que las alteraciones en el flujo autofágico contribuyen al establecimiento del fenotipo senescente en neuronas *in vitro*. Sin embargo, la causa del fallo del flujo autofágico en neuronas senescentes continúa sin respuesta. En este sentido, nosotros hemos observado fragmentación del citoesqueleto axonal en neuronas senescentes de 26 DIV. La fragmentación del citoesqueleto axonal es considerada una de las características del proceso de degeneración axonal y ha sido observada también en muchas enfermedades neurodegenerativas¹⁰⁶.

Dado que los autofagosomas se mueven a lo largo de los axones para fusionarse con los lisosomas^{107,108}, suena razonable pensar que cualquier factor que interrumpa el transporte axonal como lo es en este caso la degeneración axonal, daría lugar a una ineficiente maduración y degradación de autofagosomas y por consiguiente a la acumulación de estas vesículas autofágicas en las neuronas senescentes. De acuerdo con esto y en colaboración con el grupo del Dr. Felipe Court de la Universidad Mayor en Santiago, Chile, realizamos algunos experimentos preliminares con el objetivo de caracterizar el proceso de degeneración axonal en nuestro modelo de senescencia neuronal *in vitro*. Al analizar la integridad del citoesqueleto de las neuritas de neuronas de 6, 19 y 26 DIV por inmunofluorescencia contra neurofilamentos intermedios (NF-M) encontramos que las neuronas senescentes muestran una mayor fragmentación de estos filamentos comparando con las neuronas jóvenes de 6 DIV (Figura 13).

De manera interesante, el grupo del Dr. Felipe Court ha demostrado que la degeneración axonal inducida por distintos estímulos, ya sea por insultos químicos o mecánicos es desencadenada por la activación de la maquinaria de necroptosis¹⁰⁹⁻¹¹¹. Quizá la degeneración axonal que observamos en neuronas senescentes es iniciada por la vía de transducción de la necroptosis, aunque las neuronas senescentes están vivas. Para probar esta hipótesis, analizamos por inmunofluorescencia los niveles de la cinasa fosforilada RIPK3, una de las principales proteínas involucradas en la activación de necroptosis^{111,112}. Encontramos una abundante señal de pRIPK3 a lo largo de los axones de las neuronas senescentes en contraste con la señal nuclear de pRIPK3 en neuronas jóvenes (Figura 14), sugiriendo la posible activación de esta cinasa en el citoplasma de las neuronas senescentes.

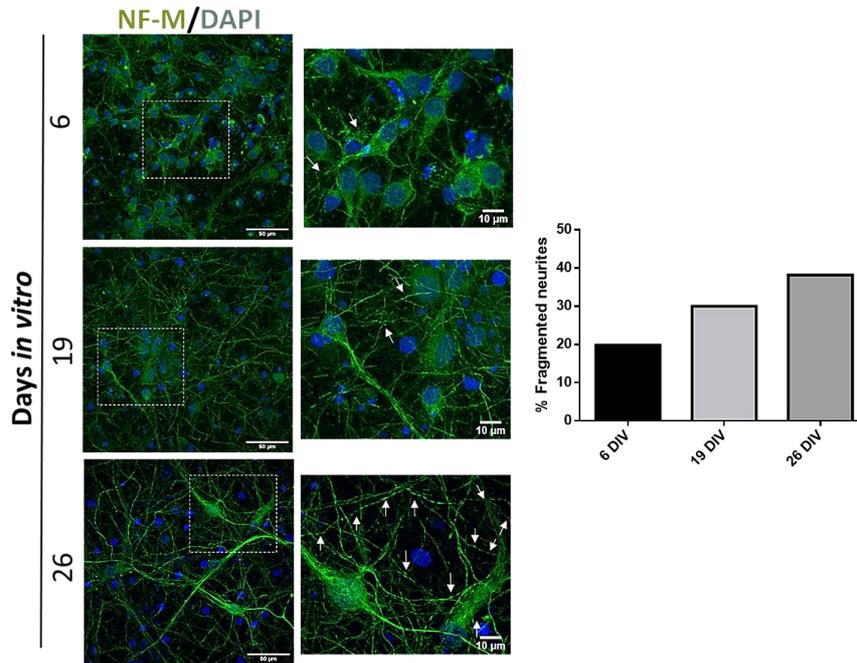


Figura 13. La fragmentación axonal aumenta en neuronas de 19 y 26 DIV. Análisis por inmunofluorescencia de neurofilamentos intermedios (NF-M) en cultivo primario de células corticales incubadas durante los días in vitro indicados. La gráfica representa el porcentaje de neuritas obtenido con ayuda del análisis de partículas del software Image J. Se usaron los siguientes parámetros para partículas fragmentadas: tamaño 0-100 μm y circularidad de 0.3-1.0. Para partículas intactas: tamaño 100-infinity μm y circularidad de 0.0-0.3. % neuritas fragmentadas = partículas fragmentadas x 100/área total. n=1.

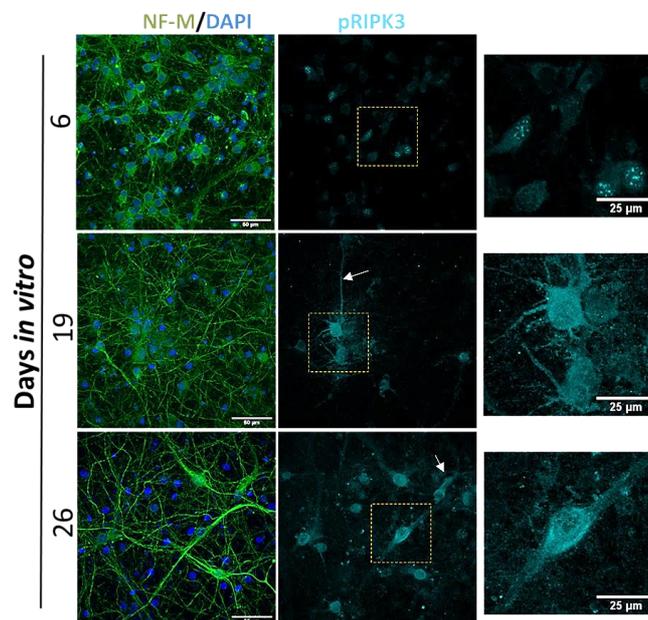


Figura 14. La señal citosólica de pRIPK3 aumenta en neuronas de 19 y 26 DIV. Análisis por inmunofluorescencia de neurofilamentos intermedios (NF-M) y pRIPK3 en cultivo primario de células corticales incubadas durante los días in vitro indicados. Las flechas indican señal de pRIPK3 en los axones de las neuronas. n=1.

Adicional a estos resultados, observamos señal citoplásmica de pRIPK3 en neuronas de 19 DIV, pero no señal de la $\gamma\text{H2A.X}$ (marcador de senescencia celular), sugiriendo que la activación de pRIPK3 precede al establecimiento de la senescencia neuronal (Figura 15). Por lo tanto, para confirmar la participación de pRIPK3 en la

senescencia neuronal, tratamos a las células corticales desde los 6 *DIV* con necrostatin-1 (nec-1), un inhibidor de la cinasa RIPK1, la cual activa a RIPK3. El tratamiento de neuronas con nec-1 retrasó la degeneración de neuritas y disminuyó el número de células positivas a la actividad SA- β -gal (Figura 16). Estos resultados preliminares sugieren la activación de RIPK3 como un mecanismo río arriba de la degeneración axonal en neuronas senescentes y como un posible inductor de senescencia celular en neuronas. Sin embargo, se requiere de mayor investigación para descifrar cuáles de las funciones de pRIPK3 en el citoplasma podrían estar involucradas en el establecimiento del fenotipo senescente neuronal.

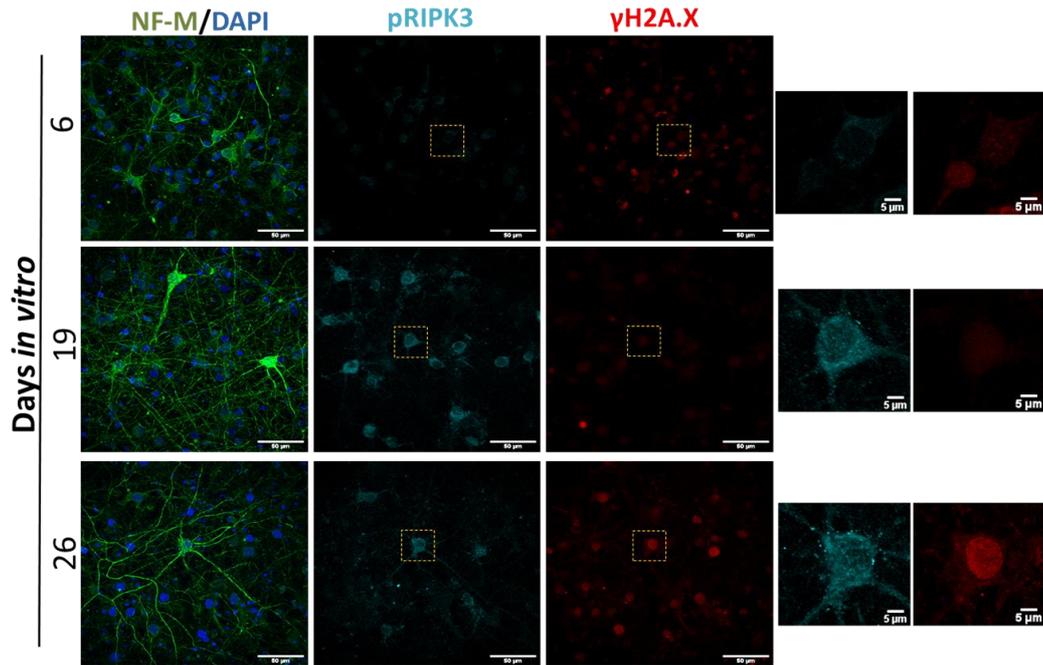


Figura 15. Señal citoplásmica de pRIPK3 precede a la activación de la respuesta al daño al DNA en neuronas senescentes. Análisis por inmunofluorescencia de neurofilamentos intermedios (NF-M), pRIPK3 y la histona γ H2A.X en cultivo primario de células corticales incubadas durante los días *in vitro* indicados. n=1.

Resulta interesante la observación de la señal citoplásmica de pRIPK3 en neuronas senescentes (Figura 14), ya que la exportación de RIPK3 del núcleo hacia el citoplasma se debe a la actividad de la exportina-1, también conocida como CRM1¹¹³. Se reportó recientemente un aumento en los niveles y en la actividad de CRM1 en fibroblastos senescentes de individuos con envejecimiento prematuro (Hutchinson-Gilford progeria síndrome-HGPS), así como en fibroblastos de individuos de más de 70 años de edad, y que ese aumento en la actividad de CRM1 induce senescencia celular⁸³. Sin embargo, se desconoce si la expresión o la actividad de CRM1 aumentan durante la senescencia neuronal y mucho menos se sabe si CRM1 participa en la exportación de RIPK3 que observamos en neuronas senescentes. Por lo tanto, analizamos la presencia de CRM1 por inmunofluorescencia en neuronas de 6 y 26 *DIV* y sorprendentemente encontramos enriquecimiento de CRM1 en las invaginaciones nucleares que le dan la apariencia arrugada al núcleo de las neuronas senescentes de 26 *DIV* (Figura 17).

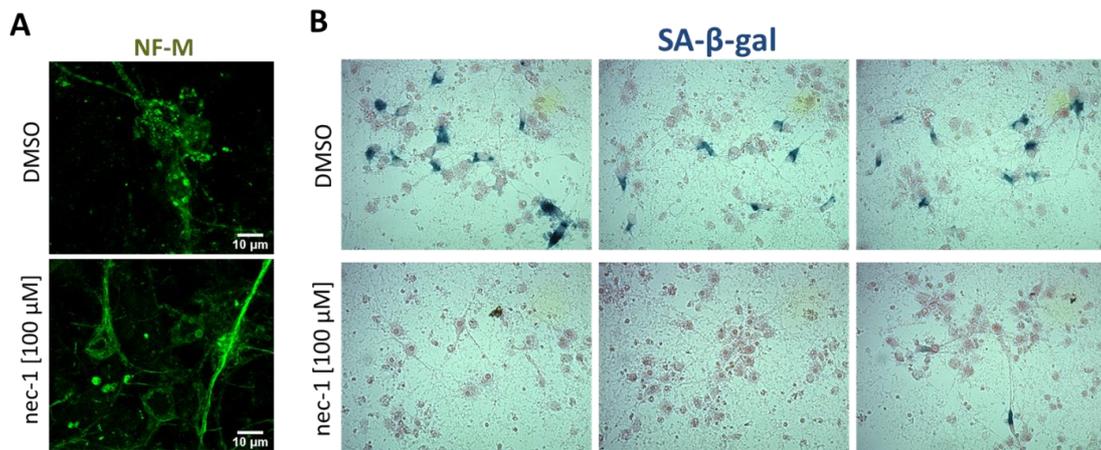


Figura 16. El tratamiento con nec-1 reduce la degeneración axonal y disminuye la actividad SA-β-gal en neuronas de 26 DIV. (A) Análisis por inmunofluorescencia de neurofilamentos intermedios (NF-M) en neuronas de 26 DIV, después del tratamiento con nec-1 (inhibidor de RIPK1). (B) Actividad SA-β-gal en células corticales de 26 DIV después del tratamiento con nec-1. n=1.

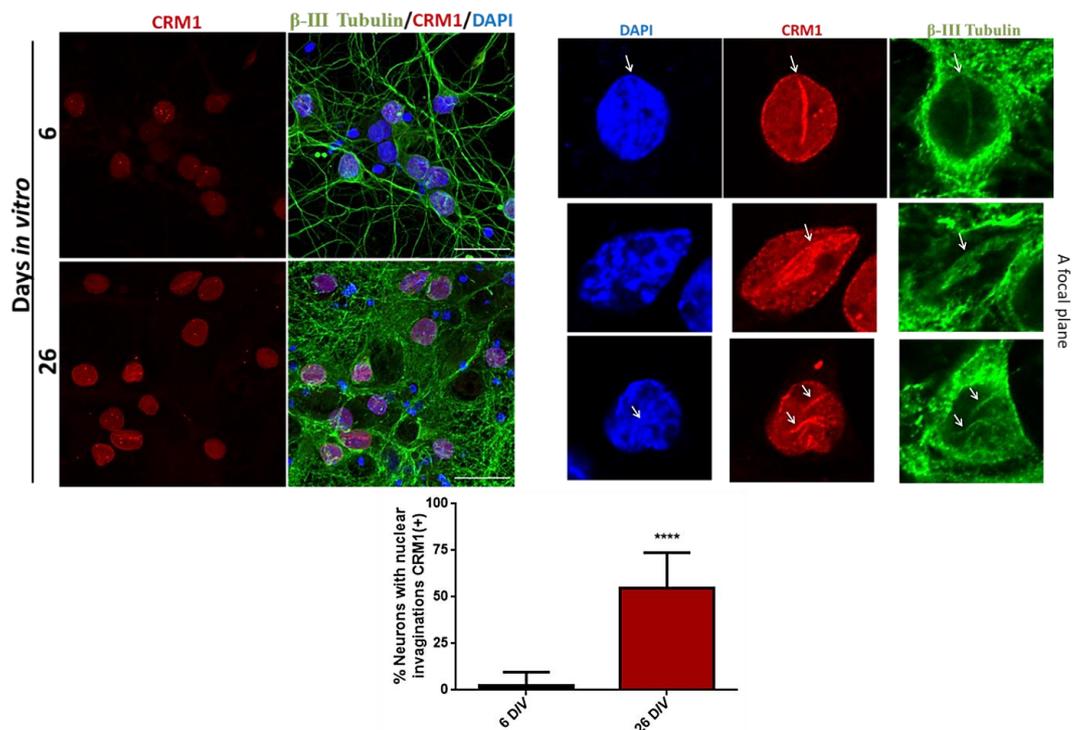


Figura 17. Enriquecimiento de CRM1 en invaginaciones nucleares de neuronas senescentes. Inmunofluorescencia para detectar CRM1 en neuronas (βIII-TUBULIN) en cultivo primario de células corticales incubadas durante los días in vitro indicados. La barra de escala representa 25 μm. La gráfica representa el porcentaje de neuronas con invaginaciones nucleares positivas a la señal de CRM1. Las barras en las gráficas representan SD, n=3; unpaired t Test Student ****p< 0.01.

Teniendo en cuenta que CRM1 tiene como blancos a más de 200 proteínas y además está encargado de la exportación de RNAs no codificantes, probablemente el enriquecimiento de CRM1 en las invaginaciones nucleares promueva la exportación de proteínas involucradas en el establecimiento y/o mantenimiento del fenotipo senescente en neuronas como, por ejemplo, la exportación de RIPK3. Si esto es cierto, la inhibición

de CRM1 afectaría el número de neuronas senescentes, así que tratamos a células corticales de 19, 22 y 25 DIV con leptomicina B (LMB), un inhibidor de CRM1. Después del tratamiento, analizamos por actividad SA- β -gal el número de células senescentes a los 26 DIV. Los resultados muestran que el tratamiento con LMB a los 19 y 25 DIV redujo el número de células positivas a SA- β -gal (Figura 18), sugiriendo que la actividad de CRM1 podría estar involucrada en la adquisición del fenotipo senescente en neuronas. Sin embargo, estos son resultados preliminares y se requieren de más experimentos para confirmar la participación CRM1 en la senescencia neuronal.

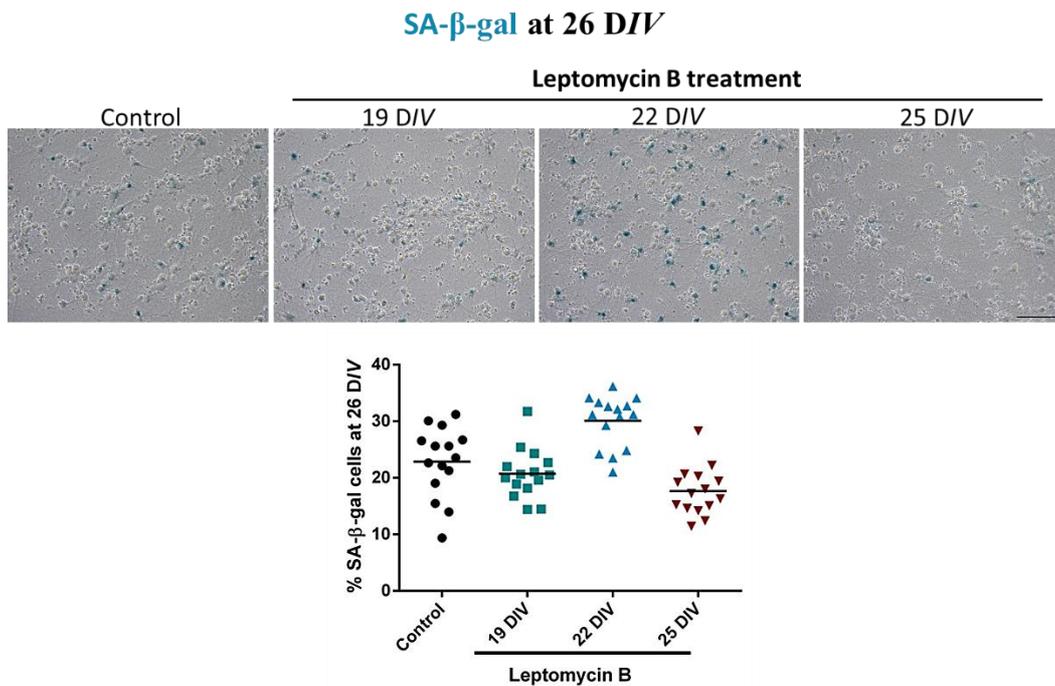


Figura 18. Inhibición de CRM1 altera el número de células corticales positivas a SA- β -gal. Actividad SA- β -gal en células corticales de 26 DIV después del tratamiento con Leptomicina B (LMB) a los tiempos indicados. La gráfica representa el porcentaje de células positivas a SA- β -gal a los 26 DIV después del tratamiento con leptomicina B (LMB). n=1.

11. Literatura Citada

1. De Cabo, R., Carmona-Gutierrez, D., Bernier, M., Hall, M. N. & Madeo, F. The search for antiaging interventions: From elixirs to fasting regimens. *Cell* **157**, 1515–1528 (2014).
2. López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M. & Kroemer, G. The hallmarks of aging. *Cell* **153**, (2013).
3. Bento, C. F. *et al.* Mammalian Autophagy: How Does It Work? *Annu. Rev. Biochem.* **85**, 685–713 (2016).
4. Wirawan, E., Berghe, T. Vanden, Lippens, S., Agostinis, P. & Vandenabeele, P. Autophagy: for better or for worse. *Cell Res.* **22**, 43–61 (2012).
5. Berry, D. L. & Baehrecke, E. H. Autophagy functions in programmed cell death. *Autophagy* **4**, 359–360 (2008).
6. Bouzas-Rodríguez, J. *et al.* The Nuclear Receptor NR4A1 Induces a Form of Cell Death Dependent on Autophagy in Mammalian Cells. *PLoS One* **7**, 118718 (2012).
7. Cuervo, A. M. *et al.* Autophagy and aging: the importance of maintaining ‘clean’ cells. *Autophagy* **1**, 131–140 (2005).
8. Rubinsztein, D. C., Mariño, G. & Kroemer, G. Autophagy and aging. *Cell* **146**, 682–695 (2011).
9. Cuervo, A. M. & Wong, E. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Res.* **24**, 92–104 (2014).
10. Kaushik, S. & Cuervo, A. M. Proteostasis and aging. *Nat. Med.* **21**, 1406–1415 (2015).
11. Hara, T. *et al.* Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* **441**, 885–9 (2006).
12. Sharpless, N. E. & Sherr, C. J. Forging a signature of in vivo senescence. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 397–408 (2015).
13. Rodier, F. & Campisi, J. Four faces of cellular senescence. *J. Cell Biol.* **192**, 547–556 (2011).
14. van Deursen, J. M. The role of senescent cells in ageing. *Nature* **509**, 439–446 (2014).
15. Maciel-Barón, L. Á. *et al.* Cellular senescence, neurological function and redox state. *Antioxid. Redox Signal.* ars.2017.7112 (2017). doi:10.1089/ars.2017.7112
16. Hernandez-Segura, A., Nehme, J. & Demaria, M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol.* **28**, 436–453 (2018).
17. Gire, V. & Dulic, V. Senescence from G2 arrest, revisited. *Cell Cycle* **14**, 297–304 (2015).
18. Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A. & Campisi, J. The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **5**, 99–118 (2010).

19. Coppé, J. P. *et al.* A human-like senescence-associated secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on physiological oxygen. *PLoS One* **5**, (2010).
20. Kuilman, T. & Peeper, D. S. Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 81–94 (2009).
21. Freund, A., Patil, C. K. & Campisi, J. p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *EMBO J.* **30**, 1536–1548 (2011).
22. Lee, B. Y. *et al.* Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase. *Aging Cell* **5**, 187–195 (2006).
23. Salama, R., Sadaie, M., Hoare, M. & Narita, M. Cellular senescence and its effector programs. *Genes Dev.* **28**, 99–114 (2014).
24. Correia-Melo, C., Hewitt, G. & Passos, J. F. Telomeres, oxidative stress and inflammatory factors: partners in cellular senescence? *Longev. Heal.* **3**, 1 (2014).
25. Terman, A. & Brunk, U. T. Lipofuscin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 1400–1404 (2004).
26. Georgakopoulou, E. A. *et al.* 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**, 37–50 (2013).
27. Lenain, C., Gussyatiner, O., Douma, S., van den Broek, B. & Peeper, D. S. Autophagy-mediated degradation of nuclear envelope proteins during oncogene-induced senescence. *Carcinogenesis* **36**, 1263–1274 (2015).
28. Dou, Z. *et al.* Autophagy mediates degradation of nuclear lamina. *Nature* **527**, 105–109 (2015).
29. Storer, M. *et al.* XSenescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell* **155**, 1119–1130 (2013).
30. Muñoz-Espín, D. *et al.* XProgrammed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell* **155**, 1104 (2013).
31. Demaria, M. *et al.* An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev. Cell* **31**, 722–733 (2014).
32. Baker, Darren J. Childs, Bennet G. Durik, Matej Wijers, Melinde E. Sieben, Cynthia J. Zhong, Jian Saltness, Rache Jeganathan, Karthik B. Versoza, Grace C. Pezeshki, Mohamad Khazaie, Khashayarsha Miller, Jordan D. Van Deursen, J. Naturally occurring p16Ink4a -positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* **530**, 184–189 (2016).
33. Yun, M. H., Davaapil, H. & Brockes, J. P. Recurrent turnover of senescent cells during regeneration of a complex structure. *Elife* **4**, 1–16 (2015).
34. Da Silva-Álvarez, S. *et al.* Cell senescence contributes to tissue regeneration in zebrafish. *Aging Cell* **19**, 1–5 (2020).
35. Braig, M. *et al.* Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* **436**, 660–665 (2005).

36. Schmitt, C. A. *et al.* A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell* **109**, 335–346 (2002).
37. Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D. & Lowe, S. W. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16(INK4a). *Cell* **88**, 593–602 (1997).
38. Di Micco, R. *et al.* Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* **444**, 638–642 (2006).
39. Ovadya, Y. *et al.* Impaired immune surveillance accelerates accumulation of senescent cells and aging. *Nat. Commun.* **9**, (2018).
40. He, S. & Sharpless, N. E. Review Senescence in Health and Disease. *Cell* **169**, 1000–1011 (2017).
41. Ohanna, M. *et al.* Senescent cells develop a parp-1 and nuclear factor- κ B-associated secretome (PNAS). *Genes Dev.* **25**, 1245–1261 (2011).
42. Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P. Y. & Campisi, J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: A link between cancer and aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 12072–12077 (2001).
43. Pan, K. *et al.* HBP1-Mediated Transcriptional Regulation of DNA Methyltransferase 1 and Its Impact on Cell Senescence. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 887–903 (2013).
44. Venturelli, S. *et al.* Differential induction of apoptosis and senescence by the DNA methyltransferase inhibitors 5-azacytidine and 5-aza-20-deoxycytidine in solid tumor cells. *Mol. Cancer Ther.* **12**, 2226–2236 (2013).
45. Barzily-Rokni, M. *et al.* Synergism between DNA methylation and macroH2A1 occupancy in epigenetic silencing of the tumor suppressor gene p16(CDKN2A). *Nucleic Acids Res.* **39**, 1326–1335 (2011).
46. Baker, D. J. *et al.* Naturally occurring p16Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* **530**, 184–189 (2016).
47. Childs, B. G. *et al.* Senescent cells: An emerging target for diseases of ageing. *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 718–735 (2017).
48. van Deursen, J. M. Senolytic therapies for healthy longevity. *Science (80-.).* **364**, 636–637 (2019).
49. Bussian, T. J. *et al.* Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline. *Nature* **562**, 578–582 (2018).
50. Jeon, O. H. *et al.* Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. *Nat. Publ. Gr.* **23**, 775–781 (2017).
51. Galluzzi, L. *et al.* Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J.* **36**, 1811–1836 (2017).
52. Kaushik, S. & Cuervo, A. M. Chaperone-mediated autophagy: A unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol.* **22**, 407–417 (2012).

53. Schneider, J. L. *et al.* Loss of hepatic chaperone-mediated autophagy accelerates proteostasis failure in aging. *Aging Cell* **14**, 249–264 (2015).
54. Kaushik, S. & Cuervo, A. M. The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 365–381 (2018).
55. Sahu, R. *et al.* Microautophagy of Cytosolic Proteins by Late Endosomes. *Dev. Cell* **20**, 131–139 (2011).
56. Uytterhoeven, V. *et al.* Hsc70-4 Deforms Membranes to Promote Synaptic Protein Turnover by Endosomal Microautophagy. *Neuron* **88**, 735–748 (2015).
57. Khaminets, A., Behl, C. & Dikic, I. Ubiquitin-Dependent And Independent Signals In Selective Autophagy. *Trends Cell Biol.* **26**, 6–16 (2016).
58. Xie, Z. & Klionsky, D. J. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat. Cell Biol.* **9**, 1102–1109 (2007).
59. Acevo-rodríguez, P. S., Maldonado, G. & Castro-obregón, S. Autophagy Regulation by the Translation Machinery and Its Implications in Cancer. **10**, 1–17 (2020).
60. Piccioli, P. & Rubartelli, A. The secretion of IL-1?? and options for release. *Semin. Immunol.* **25**, 425–429 (2013).
61. Ponpuak, M. *et al.* Secretory autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.* **35**, 106–116 (2015).
62. Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M. & Klionsky, D. J. NIH Public Access. *Nature* **451**, 1069–1075 (2008).
63. Manuscript, A. NIH Public Access. *Growth (Lakeland)* **23**, 1–7 (2008).
64. Van Limbergen, J., Stevens, C., Nimmo, E., Wilson, D. & Satsangi, J. Autophagy: from basic science to clinical application. *Mucosal Immunol.* **2**, 315–330 (2009).
65. Cuervo, A. M. Autophagy: In sickness and in health. *Trends Cell Biol.* **14**, 70–77 (2004).
66. Komatsu, M. *et al.* Homeostatic Levels of p62 Control Cytoplasmic Inclusion Body Formation in Autophagy-Deficient Mice. *Cell* **131**, 1149–1163 (2007).
67. Young, A. R. J. *et al.* Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev.* **23**, 798–803 (2009).
68. Young, A. R. J. & Narita, M. Connecting autophagy to senescence in pathophysiology. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 234–240 (2010).
69. Moreno-Blas, D., Gorostieta-Salas, E. & Castro-Obregón, S. Connecting chaperone-mediated autophagy dysfunction to cellular senescence. *Ageing Res. Rev.* **41**, 34–41 (2018).
70. Narita, M. *et al.* Spatial Coupling of mTOR and Autophagy Augments Secretory Phenotypes. *Science (80-.)*. **332**, 966–970 (2011).
71. Kang, H. T., Lee, K. B., Kim, S. Y., Choi, H. R. & Park, S. C. Autophagy impairment induces premature senescence in primary human fibroblasts. *PLoS*

- One* **6**, 1–12 (2011).
72. Jurk, D. *et al.* Postmitotic neurons develop a p21-dependent senescence-like phenotype driven by a DNA damage response. *Aging Cell* **11**, 996–1004 (2012).
 73. Uday Bhanu, M., Mandraju, R. K., Bhaskar, C. & Kondapi, A. K. Cultured cerebellar granule neurons as an in vitro aging model: Topoisomerase II?? as an additional biomarker in DNA repair and aging. *Toxicol. Vitro*. **24**, 1935–1945 (2010).
 74. Chernova, T., Nicotera, P. & Smith, A. G. Heme deficiency is associated with senescence and causes suppression of N-Methyl-D-aspartate receptor subunits expression in primary cortical neurons. *Mol. Pharmacol.* **69**, 697–705 (2006).
 75. Geng, Y. Q., Guan, J. T., Xu, X. H. & Fu, Y. C. Senescence-associated beta-galactosidase activity expression in aging hippocampal neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **396**, 866–869 (2010).
 76. Dong, W. *et al.* Mitochondrial dysfunction in long-term neuronal cultures mimics changes with aging. *Med. Sci. Monit.* **17**, BR91-6 (2011).
 77. Bigagli, E. *et al.* Long-term neuroglial cocultures as a brain aging model: Hallmarks of senescence, microRNA expression profiles, and comparison with in vivo models. *Journals Gerontol. - Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* **71**, 50–60 (2016).
 78. Song, J. *et al.* Agmatine Ameliorates High Glucose-Induced Neuronal Cell Senescence by Regulating the p21 and p53 Signaling. *Exp. Neurobiol.* **25**, 24–32 (2016).
 79. Toescu, E. C. & Verkhratsky, a. Neuronal ageing in long-term cultures: alterations of Ca²⁺ homeostasis. *Neuroreport* **11**, 3725–9 (2000).
 80. Debaq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J. D., Campisi, J. & Toussaint, O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-βgal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat. Protoc.* **4**, 1798–1806 (2009).
 81. Rosas-Arellano, A. *et al.* A simple solution for antibody signal enhancement in immunofluorescence and triple immunogold assays. *Histochem. Cell Biol.* **146**, 421–430 (2016).
 82. Moreno-Blas, D. *et al.* Cortical neurons develop a senescence-like phenotype promoted by dysfunctional autophagy. *Aging (Albany. NY).* **11**, 6175–6198 (2019).
 83. García-Aguirre, I. *et al.* Enhanced nuclear protein export in premature aging and rescue of the progeria phenotype by modulation of CRM1 activity. *Aging Cell* **18**, 1–14 (2019).
 84. Kang, C. *et al.* The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4. *Science (80-.).* **349**, aaa5612-aaa5612 (2015).
 85. Jin, H. J. *et al.* Senescence-Associated MCP-1 Secretion Is Dependent on a Decline in BMI1 in Human Mesenchymal Stromal Cells. *Antioxid. Redox Signal.* **24**, 471–485 (2016).

86. Lee, J. Y. *et al.* GATA4-dependent regulation of the secretory phenotype via MCP-1 underlies lamin A-mediated human mesenchymal stem cell aging. *Exp. Mol. Med.* **50**, (2018).
87. Mauthe, M. *et al.* Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy* **14**, 1435–1455 (2018).
88. Liu, J. *et al.* Beclin1 controls the levels of p53 by regulating the deubiquitination activity of USP10 and USP13. *Cell* **147**, 223–234 (2011).
89. Mayer, A. L. *et al.* SLC2A8 (GLUT8) is a mammalian trehalose transporter required for trehalose-induced autophagy. *Sci. Rep.* **6**, 1–15 (2016).
90. Wei, Z. *et al.* Amyloid ?? protein aggravates neuronal senescence and cognitive deficits in 5XFAD mouse model of Alzheimer??s disease. *Chin. Med. J. (Engl.)* **129**, 1835–1844 (2016).
91. Chinta, S. J. *et al.* Cellular senescence and the aging brain. *Exp. Gerontol.* **68**, 3–7 (2015).
92. Cao, K. *et al.* Rapamycin Reverses Cellular Phenotypes and Enhances Mutant Protein Clearance in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome Cells. *Sci. Transl. Med.* **3**, 89ra58-89ra58 (2011).
93. Frost, B., Bardai, F. H. & Feany, M. B. Lamin Dysfunction Mediates Neurodegeneration in Tauopathies. *Curr. Biol.* **26**, 129–136 (2016).
94. Paonessa, F. *et al.* Microtubules Deform the Nuclear Membrane and Disrupt Nucleocytoplasmic Transport in Tau-Mediated Frontotemporal Dementia. *Cell Rep.* **26**, 582–593.e5 (2019).
95. Cornelison, G. L., Levy, S. A., Jenson, T. & Frost, B. Tau-induced nuclear envelope invagination causes a toxic accumulation of mRNA in Drosophila. *Aging Cell* **18**, 1–7 (2019).
96. Morgan, T. E. *et al.* Increased transcription of the astrocyte gene GFAP during middle-age is attenuated by food restriction: Implications for the role of oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **23**, 524–528 (1997).
97. Parpura, V., Zorec, R. & Verkhratsky, A. Astrocytes in physiological ageing and Alzheimeŕs disease. *Neuroscience* (2015).
doi:10.1016/j.neuroscience.2015.01.007
98. Neurons, P. D. *et al.* Loss of SATB1 Induces p21-Dependent Cellular Article Loss of SATB1 Induces p21-Dependent Cellular Senescence in Post-mitotic Dopaminergic Neurons. *Stem Cell* **25**, 514–530.e8 (2019).
99. Jin, H. J. *et al.* Senescence-Associated MCP-1 Secretion Is Dependent on a Decline in BMI1 in Human Mesenchymal Stromal Cells. *Antioxid. Redox Signal.* **24**, 471–485 (2016).
100. Kang, C. & Elledge, S. J. How autophagy both activates and inhibits cellular senescence. *Autophagy* **12**, 898–899 (2016).
101. Kang, C. *et al.* The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4. *Science* **349**, aaa5612 (2015).

102. Han, X. *et al.* AMPK activation protects cells from oxidative stress-induced senescence via autophagic flux restoration and intracellular NAD⁺ elevation. *Aging Cell* **15**, 416–427 (2016).
103. Adams, P. D. *et al.* Lysosome-mediated processing of chromatin in senescence. *J. Cell Biol.* **202**, 129–143 (2013).
104. Piechota, M. *et al.* Is senescence-associated β -galactosidase a marker of neuronal senescence? *Oncotarget* **7**, 81099–81109 (2016).
105. Agnihotri, S. *et al.* A GATA4-regulated tumor suppressor network represses formation of malignant human astrocytomas. *J. Exp. Med.* **208**, 689–702 (2011).
106. Wang, Y., Song, M. & Song, F. Neuronal autophagy and axon degeneration. *Cell. Mol. Life Sci.* **75**, 2389–2406 (2018).
107. Maday, S., Wallace, K. E. & Holzbaur, E. L. F. Autophagosomes initiate distally and mature during transport toward the cell soma in primary neurons. *J. Cell Biol.* **196**, 407–417 (2012).
108. Farfel-Becker, T. *et al.* Neuronal Soma-Derived Degradative Lysosomes Are Continuously Delivered to Distal Axons to Maintain Local Degradation Capacity. *Cell Rep.* **28**, 51–64.e4 (2019).
109. Hernández, D. E. *et al.* Axonal degeneration induced by glutamate excitotoxicity is mediated by necroptosis. *J. Cell Sci.* **131**, jcs214684 (2018).
110. Arrázola, M. S. *et al.* Axonal degeneration is mediated by necroptosis activation. *J. Neurosci.* **39**, 3832–3844 (2019).
111. Oñate, M. *et al.* The necroptosis machinery mediates axonal degeneration in a model of Parkinson disease. *Cell Death Differ.* (2019). doi:10.1038/s41418-019-0408-4
112. Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T. & Kroemer, G. Molecular mechanisms of necroptosis: An ordered cellular explosion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 700–714 (2010).
113. Weber, K., Roelandt, R., Bruggeman, I., Estornes, Y. & Vandenabeele, P. Nuclear RIPK3 and MLKL contribute to cytosolic necrosome formation and necroptosis. *Commun. Biol.* **1**, 1–13 (2018).

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. 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 5 min 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 h.

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/mlX-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 min 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 min a temperatura ambiente.
5. Lavar con PBS 1X 2 veces
6. Bloquear durante 30 min 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 h) 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 min 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 min 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.

ANEXO 4

Publicaciones generadas durante el desarrollo del proyecto de investigación

1. **Moreno-Blas, D.**, Gorostieta-Salas, E. and Castro-Obregón, S. (2018). Connecting chaperone-mediated autophagy dysfunction to cellular senescence. *Ageing Research Reviews* 41: 34–41. doi: 10.1016/j.arr.2017.11.001. Anexo 5
2. **Moreno-Blas, D.**, Gorostieta-Salas, E., Pommer-Alba, A., Muciño-Hernández, G., Gerónimo-Olvera, C., Maciel-Barón L.Á., Königsberg M., Massieu, L. and Castro-Obregón, S. (2019). Cortical neurons develop a senescence-like phenotype promoted by dysfunctional autophagy. *Aging (Albany NY)* 11(16): 6175-6198. doi: 10.18632/aging.102181. Anexo 6
3. Elisa Gorostieta-Salas, **Daniel Moreno-Blas**, Cristian Gerónimo-Olvera, Bulmaro Cisneros, Felipe A Court & Susana Castro-Obregón. (2019). CRM1 overexpression in neurons correlates with autophagy dysfunction and neuronal senescence during brain aging. *Aging Cell* (In preparation).
4. Elisa Gorostieta-Salas, **Daniel Moreno-Blas**, Bulmaro Cisneros, Federico Bermudes-Rattoni & Susana Castro-Obregón. (2019). Autophagy induction reduces senescent features in hippocampal neurons of old rats. (In preparation).
5. Gorostieta-Salas, E., **Moreno-Blas, D.** and Castro-Obregón, S. (2019). Regulation of autophagy by non-coding RNAs in neurodegeneration. *Mol Neurobiol* (In preparation).
6. Muciño-Hernández, G., **Moreno-Blas, D.** and Castro-Obregón, S. (2020). Molecular implications and pathophysiological consequences of nucleophagy. *Autophagy* (In preparation).

Capítulo de libro

1. **Moreno Blas D.** (2017). Regeneración y rejuvenecimiento ¿Será posible? Libro: ¿Por qué envejecemos? y otras historias... Volumen 1, 265-276.

Publicaciones generadas en colaboración

1. Maciel-Barón L.A., **Moreno-Blas D.**, Morales-Rosales S.L., González-Puertos V.Y., López-Díazguerrero NE., Torres C., Castro-Obregón S. & Königsberg M. (2018). Cellular senescence, neurological function and redox state. *Antioxid Redox Signal* 28(18): 1704-1723. doi: 10.1089/ars.2017.7112.
2. Diener C., Garza Ramos Martínez G., **Moreno-Blas D.**, Castillo González D.A., Corzo G., Castro Obregon S. & Del Rio G. (2016). Effective Design of

Multifunctional Peptides by Combining Compatible Functions. *PLoS Comput Biol.* 12(4):e1004786. doi: 10.1371/journal.pcbi.1004786.

3. Erika A. Peláez Coyotl, Jacqueline Barrios, Gabriel Muciño, **Daniel Moreno Blas**, Miguel Costas, Teresa Montiel Montes, Salvador Uribe, Lourdes Massieu Trigo, Susana Castro-Obregón, Dulce Mata Espinosa, Jorge Barrios Payan, Juan Carlos Leon Contreras, Rogelio Hernandez-Pando, Gabriel Del Rio. (2020). Autophagy induced by an antimicrobial peptide in mammalian cells as an effective treatment for tuberculosis (Sometido).



Contents lists available at ScienceDirect

Ageing Research Reviews

journal homepage: www.elsevier.com/locate/arr

Review

Connecting chaperone-mediated autophagy dysfunction to cellular senescence



Daniel Moreno-Blas, Elisa Gorostieta-Salas, Susana Castro-Obregón*

Department of Neurodevelopment and Physiology, Institute of Cellular Physiology, National Autonomous University of México (UNAM), Mexico City, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:
Aging
Cellular senescence
Chaperone-mediated autophagy
Macroautophagy
Proteostasis

ABSTRACT

Chaperone-mediated autophagy (CMA) is one of the main pathways of the lysosome-autophagy proteolytic system. It regulates different cellular process through the selective degradation of cytosolic proteins. In ageing, the function of CMA is impaired causing an inefficient stress response and the accumulation of damaged, oxidized or misfolded proteins, which is associated with numerous age-related diseases. Deficient protein degradation alters cellular proteostasis and activates signaling pathways that culminate in the induction of cellular senescence, whose accumulation is a typical feature of ageing. However, the relationship between CMA activity and cellular senescence has been poorly studied. Here, we review and integrate evidence showing that CMA dysfunction correlates with the acquisition of many hallmarks of cellular senescence and propose that loss of CMA function during aging promotes cellular senescence.

1. Introduction

1.1. Hallmarks of cellular senescence

Cellular senescence is a particular phenotype characterized by a permanent cell cycles arrest accompanied by a lack of response to mitotic and apoptotic stimuli. This phenotype is induced by various conditions including telomere dysfunction, reactive oxygen species, DNA damage, oncogene activation and developmental cues (Childs et al., 2015; van Deursen, 2014). Therefore, senescence is often named according to the stimulus inducing it. Replicative senescence occurs in response to telomere shortening during cell proliferation, which triggers the DNA damage response (DDR) and signals to cell cycle inhibition (Blasco et al., 1997; Di Micco et al., 2008). Oncogene-induced senescence (OIS) is triggered by the action of oncogenes such as oncogenic *ras* (Serrano et al., 1997). Stress-induced premature senescence (SIPS) is induced by exposure to different stress signals such as oxidative stress (Mas-Bargues et al., 2017), radiation (Chainiaux et al., 2002) or nonphysiologic culture conditions (including hyperoxia, interruption of cell–cell contacts, loss of interactions between different cell types and plating on plastic) (Sherr and DePinho, 2000). Programmed senescence occurs during embryogenesis and in the placenta, in response to developmental cues (Muñoz-Espín et al., 2013; Storer et al., 2013). Regardless of the induction signal, senescent cells show several common features that together define the senescent state (Fig. 1) reviewed

elsewhere, for example (He and Sharpless, 2017; Maciel-Barón et al., 2017). The signaling pathways to activate cellular senescence converge on the expression of the cell cycle inhibitors *p21/Cdk1a* (Passos et al., 2010) and/or *p16/Cdkn2a* (Baker et al., 2016; Burd et al., 2013), which seem to promote the senescence state in addition to halting the cell cycle. Some of the hallmarks of cellular senescence are a persistent DDR, commonly associated with DNA breaks, activation of ATM and ATR kinases and phosphorylation of the H2A.X histone (γ H2AX) (Kang et al., 2015a,b; Wang et al., 2009b). There are noticeable changes in chromatin structure, known as senescence-associated heterochromatin foci (SAHF) associated with altered gene expression (Narita et al., 2003). Lysosomes are enlarged and accumulate non-digestible complexes such as lipofuscin (Georgakopoulou et al., 2013) and have increased senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) activity (Debacq-Chainiaux et al., 2009). There are also morphological changes, as senescent cells accumulate vesicles and stress granules, and in the nuclear envelope there are patches of Lamin-B1 degradation (Dou et al., 2015; Lukasova et al., 2016).

Both during embryo development and adulthood, senescent cells perform several physiological roles, like promoting tissue remodeling and preventing tumor progression, through the secretion of a large set of molecules such as cytokines, chemokines, growth factors and metalloproteases, which are collectively known as senescence-associated secretory phenotype (SASP). These same secreted factors attract immune effector cells, which actively remove senescent cells (Coppé et al.,

* Corresponding Author: Department of Neurodevelopment and Physiology, Division of Neurosciences, Institute of Cellular Physiology, UNAM. Circuito Exterior, S/N, Ciudad Universitaria 04510, México.

E-mail addresses: dmoreno@email.ifc.unam.mx (D. Moreno-Blas), elisag@email.ifc.unam.mx (E. Gorostieta-Salas), scastro@ifc.unam.mx (S. Castro-Obregón).

<https://doi.org/10.1016/j.arr.2017.11.001>

Received 21 September 2017; Received in revised form 26 October 2017; Accepted 3 November 2017

Available online 04 November 2017

1568-1637/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

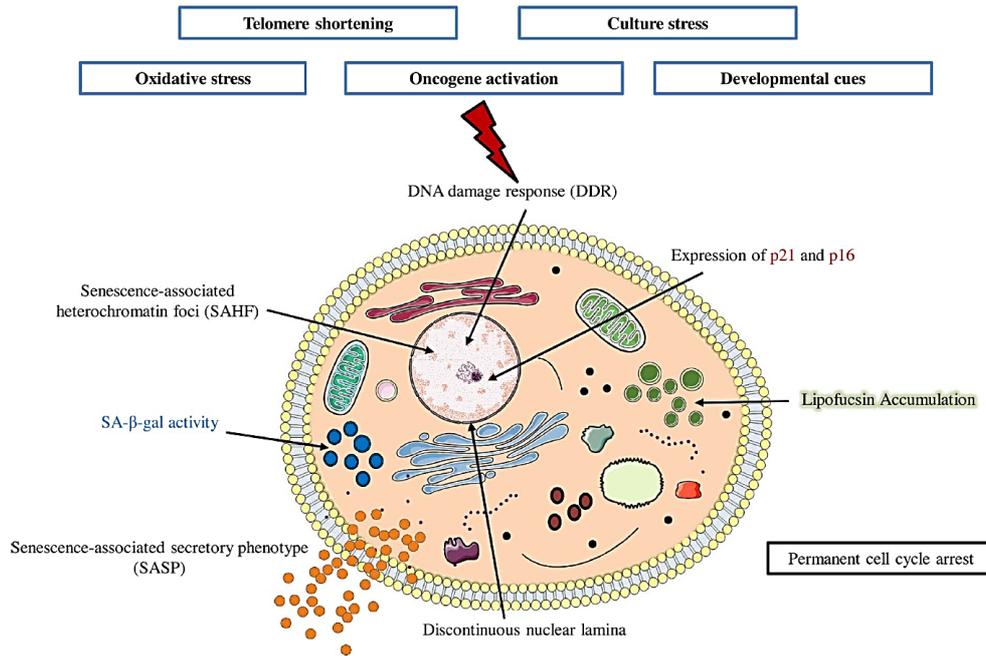


Fig. 1. Hallmarks of cellular senescence. The senescent phenotype is induced by several stimuli, such as telomere shortening during proliferation, oxidative stress, oncogene activation, culture stress and developmental cues. In these conditions, cells undergo a permanent cell cycle arrest and acquire several characteristics including DDR, lipofuscin accumulation, increased SA- β -gal activity, expression of p21/CDKN1A and/or p16/CDKN2A, senescence-associated heterochromatin foci (SAHF), lamin B1 loss and a senescence-associated secretory phenotype (SASP).

2010a; Coppé et al., 2010b; van Deursen, 2014; Muñoz and Serrano, 2014). As we age, though, senescent cells are not efficiently cleared leading to their accumulation and persistence in various tissues, altering the structure and function of organs and becoming one of the main drivers of ageing and age-related diseases (López-otín et al., 2013). Actually, chemical or genetic interventions that eliminate persistent senescent cells improve organismal health (Baker et al., 2016, 2011; Chang et al., 2015; Jeon et al., 2017). Therefore, understanding the molecular basis of senescence establishment and persistence during aging has a wide biomedical impact.

1.2. Cellular senescence is modulated by autophagy

Autophagy is a catabolic pathway that degrades intracellular components through lysosomes, generating basic biomolecules to be recycled into the cytosol or secreted by the cell and has been extensively reviewed (Bento et al., 2016). In recent years, different functions of autophagy have been discovered, linking anabolic processes with autophagic degradation (Kaur and Debnath, 2015). For example, protein degradation by autophagy preserves the intracellular amino acids pool to be utilized for synthesis of total proteins (Onodera and Ohsumi, 2005). The degradation of lipids by autophagy (lipophagy) provides free fatty acids to be used in the β -oxidation and the tricarboxylic acid (TCA) cycle to produce energy (Singh et al., 2009). And the autophagic degradation of glycogen (glycophagy) releases glucose that can be used by glycolysis for ATP production (Kaur and Debnath, 2015). Furthermore, beyond degradation of cytosolic components, autophagy mediates the unconventional secretion of proteins such as interleukin-1 β (IL-1 β), IL-18 and the high mobility group protein B1 (HMGB1) (Dupont et al., 2011). Some of those functions can contribute to the establishment of the senescent phenotype.

Based on the different ways to introduce the cytoplasmic material into the lysosomal lumen, three main types of autophagy have been described in mammalian cells: endosomal microautophagy (Sahu et al., 2011), macroautophagy (Ohsumi, 2014) and chaperone-mediated autophagy (CMA) (Cuervo and Dice, 2000).

Macroautophagy is the best characterized type of autophagy, where the cytoplasmic material to be degraded is first engulfed into double-membrane vesicles called autophagosomes. The enclosed material includes proteins and organelles among other cell constituents, and even pathogens. Then, autophagosomes move through the cell to fuse with lysosomes and the engulfed cytoplasmic components, along with the inner membrane of the autophagosome, are degraded by the lysosomal hydrolytic enzymes. The molecular machinery of macroautophagy has been reviewed by others (Klionsky and Schulman, 2014; Mizushima et al., 2011; Xie and Klionsky, 2007).

Macroautophagy has a dual role over the process of cellular senescence. On one hand, interfering the expression of essential genes for the formation of autophagosomes, such as *Atg7* and *Atg12*, induces premature senescence in human fibroblasts (Kang et al., 2011). Accordingly, also in human cells, suppression of the selective degradation of the transcription factor GATA4 by macroautophagy leads to senescence, since GATA4 induces the expression of SASP molecules (Kang et al., 2015a,b). On the other hand, macroautophagy is required in oncogene-induced senescence to form a cytoplasmic compartment known as TOR-autophagy spatial coupling compartment (TASCC), involved in the production of SASP molecules, and hence contributing to senescence transition (Narita et al., 2011). The role of macroautophagy on cellular senescence has been reviewed by others (Capparelli et al., 2012; Kang et al., 2015a,b, 2011; Kang and Elledge, 2016; Luo et al., 2011; Sasaki et al., 2010), whereas the role of endosomal microautophagy and CMA in senescence has been poorly described. In this review we focus on

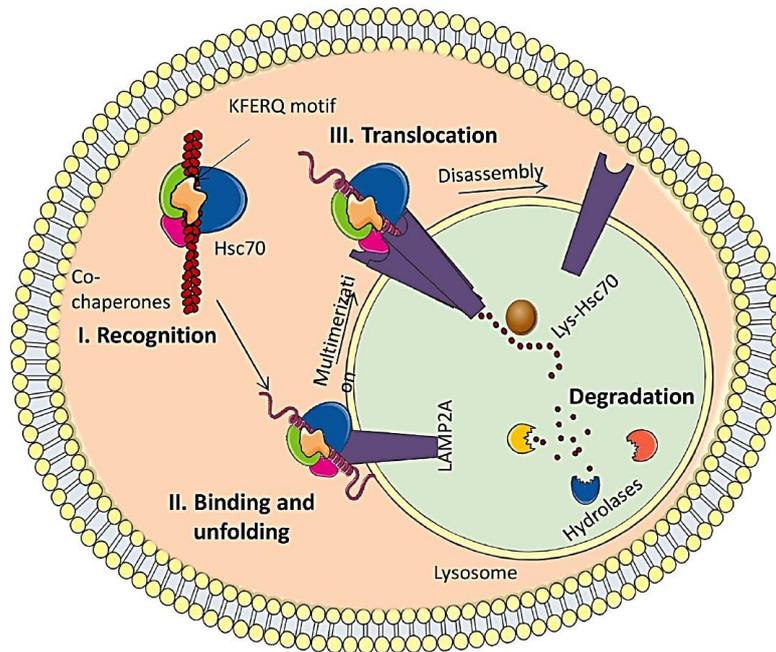


Fig. 2. Core machinery of CMA. I. Recognition, proteins targeted for degradation are recognized through an exposed KFERQ motif by the HSC70 chaperone and co-chaperones. II. Binding and unfolding, the chaperone complex carries the protein to the lysosomal surface where it is recognized by the transmembrane protein LAMP2A. At this point, the target protein is unfolded assisted by chaperones. III. Translocation and degradation, LAMP2A multimerizes to form a pore through which the unfolded protein is internalized to the lysosomal lumen and it is degraded by the hydrolases.

CMA and discuss the evidence that led us to propose that alterations of this pathway during ageing could contribute to the establishment of the senescent phenotype.

2. Core machinery of CMA

During CMA single proteins, assisted by a chaperone complex, are directly translocated across the lysosomal membrane to be degraded by hydrolases. The CMA process can be divided into three steps: 1) Recognition, 2) Binding and unfolding, and 3) Translocation and degradation (Fig. 2).

2.1. Recognition

Each protein targeted for degradation by CMA contains in its amino acid sequence a specific pentapeptide motif known as KFERQ, composed generally of a glutamine residue (Q) either at the beginning or the end of the motif, a positively charged residue that can be lysine (K) or arginine (R), a hydrophobic amino acid, either phenylalanine (F), valine (V), leucine (L) or isoleucine (I), and a negatively charged residue, either glutamic acid (E) or aspartic acid (D). The specific sequence can vary, but the physicochemical properties are maintained. About 30% of the cytosolic proteins contain a KFERQ motif (Chiang et al., 1989), but by post-translational modifications such as phosphorylation and acetylation, KFERQ-like motifs can be generated (Lv et al., 2011; Thompson et al., 2009), increasing the number of target proteins degraded by CMA. The heat shock protein of 70 kDa (HSPA8/HSC70) recognizes and interacts with this motif in the cytosol. Once bound, HSPA8/HSC70 along with co-chaperones carry the target protein to the surface of the lysosomal membrane (Cuervo and Wong, 2014; Dice, 1982; Kaushik and Cuervo, 2012).

2.2. Binding and unfolding

Once at the surface of the lysosome, the target protein/HSC70

complex binds to the transmembrane protein lysosome-associated membrane protein type 2A (LAMP2A). This interaction induces LAMP2A multimerization forming a translocation complex at the lysosomal membrane, which allows the target protein import into the lysosomal lumen (Cuervo and Wong, 2014; Kaushik and Cuervo, 2012; Xilouri et al., 2016). Only unfolded proteins can cross the lysosomal membrane through the LAMP2A complex (Salvador et al., 2000). The unfolded process is likely conducted by the HSPA8/HSC70 and co-chaperones, but it still needs clarification (Xilouri and Stefanis, 2016). Since the availability and function of LAMP2A are fundamental factors for the correct translocation of proteins into the lysosomal lumen, a reduction of LAMP2A is commonly used as a marker for low CMA activity (Bandyopadhyay et al., 2008; Cuervo and Wong, 2014).

2.3. Translocation and degradation

It has been proposed that the lysosomal chaperone HSC70 (lys-HSC70), located in the lysosome lumen, holds and pulls the target protein into the lumen through the LAMP2A complex, leading to the internalization of the target protein. Once internalized, the target protein is degraded by lysosomal enzymes. After translocation, LAMP2A multimer is disassembled into monomers by HSPA8/HSC70 action, allowing LAMP2 monomers to interact with another substrate protein and the CMA cycle starts again (Cuervo and Wong, 2014).

3. CMA impairment induces cellular senescence

Based on several observations we review here, we propose that CMA decline contributes to aging by inducing cellular senescence. First of all, during aging there is a decline in CMA function, primarily due to a decrease in LAMP2A (Cuervo and Dice, 2000; Kiffin et al., 2007; Schneider et al., 2015) and its inefficient multimerization (Rodríguez-Navarro et al., 2012). LAMP2A molecules destined for degradation are mobilized to domains in the lysosome membrane with a specific lipid composition, enriched in proteases like Cathepsin A that degrade

LAMP2A. In old mice, lipid composition of the lysosomal membrane is altered having higher content of cholesterol and ceramides, which causes the formation of wider degradation membrane domains where more LAMP2A molecules accumulate and get degraded, reducing the abundance of LAMP2A. At the same time, higher cholesterol reduces membrane fluidity, which interferes with LAMP2A multimerization to form translocation complexes. Therefore, decreased CMA activity with aging is a combination of less LAMP2A proteins and less translocation complexes (Rodríguez-Navarro et al., 2012).

Several observations indicate that during cellular senescence CMA activity is impaired. For example, in senescent mouse embryonic fibroblasts LAMP2A is reduced (Kiffin et al., 2007) and in senescent IMR-90 human diploid lung fibroblasts, a substantial proportion of HSPA8/HSC70 is modified with advanced glycation end products (Unterluggauer et al., 2009), presumably impairing its function. During replicative senescence there is a reduced rate of degradation of RNase A, a well-known substrate of CMA (Cuervo and Dice, 2000a; Dice, 1982). Interestingly, in neurons derived from Danon disease patients, a pathological condition caused by LAMP2 deficiency, there is an accumulation of lipofuscin (Furuta et al., 2013), as well as in LAMP-2-deficient murine neurons (Rothaug et al., 2015; Xilouri et al., 2016), suggesting an accelerated senescence in the brain. Finally, CMA impairment is sufficient to induce cellular senescence in primary human fibroblasts, as RNAi-knockdown of LAMP2A induces expression of *p21/Cdkn1a* and *p16/Cdkn2a*, cell cycle arrest, an enlarged morphology, increased SA- β -gal activity, ROS and lipofuscin accumulation, (Kang et al., 2011).

3.1. CMA dysfunction generates DNA damage and activates DDR, possibly triggering cellular senescence

As mentioned above, persistent DDR is one of the main features of senescent cells (Rodier and Campisi, 2011; van Deursen, 2014). Failure in CMA activity results in an inefficient degradation and consequently a persistent accumulation of activated checkpoint kinase 1 (CHK1) in the nucleus, which causes increased accumulation of DNA damage and genomic instability after exposure to γ -irradiation and etoposide treatment (Park et al., 2015), both common DNA-damaging stimuli that induce cellular senescence (Lukasova et al., 2016; Nagano et al., 2016). Reduced LAMP2A also increases γ H2A.X (Park et al., 2015), a signal that facilitates the focal assembly of checkpoint and DNA repair factors after DNA damage. Therefore, γ H2A.X presence is indicative of DDR (Wang et al., 2009a). These findings indicate that failure in CMA function activates DDR, a signaling pathway behind several inducers of cellular senescence (Muñoz-Espín and Serrano, 2014).

An intracellular increase of reactive oxygen species, either by directly exposing cells to hydrogen peroxide or endogenously produced (*i.e.* by mitochondrial dysfunction) can induce DNA damage, activation of DDR and cellular senescence (Correia-Melo et al., 2014; Lu and Finkel, 2008; Passos and Von Zglinicki, 2006). Interestingly, oxidative stress also induces the activation of CMA to contribute to the removal of oxidized proteins and overcome any possible cellular damage (Kaushik et al., 2006; Kiffin et al., 2004; Saha, 2012; Zhang et al., 2014). Considering that in aging CMA function declines, a diminished response to oxidative stress would cause accumulation of oxidized proteins, contributing to an increase of senescent cells in old tissues.

3.2. CMA dysfunction contributes to cell cycle arrest, inducing *Cdkn1a* expression, *p21* protein stabilization and cellular senescence

Permanent cell cycle arrest is a hallmark of cellular senescence and expression of *p21/Cdkn1a*, a cyclin-dependent kinase inhibitor, is a key factor (Jung et al., 2010; Satyanarayana et al., 2008; Childs et al., 2015). Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) is a transcription factor that functions as a master regulator of oxygen homeostasis, inducing the expression of most hypoxia-inducible genes. Interestingly, HIF-1 α

derepresses *p21/Cdkn1a* by displacing MYC from *p21/Cdkn1a* promoter in the absence of a hypoxic signal (Koshiji et al., 2004). Since HIF-1 α is a target of CMA (Hubbi et al., 2014; Hubbi and Semenza, 2015), CMA dysfunction during aging could contribute to the expression of *p21/Cdkn1a* by the inefficient degradation of HIF-1 α in lysosomes, leading to cellular senescence.

On the other hand, STUB1/CHIP, an E3 ubiquitin ligase that labels proteins for proteasomal degradation (Murata et al., 2003), has also been shown to mediate the degradation of proteins by CMA through the interaction with other chaperones such as HSP90 in addition to HSPA8/HSC70, also through LAMP2A (Arndt et al., 2010; Ferreira et al., 2013; Han et al., 2017). Interestingly, STUB1/CHIP mediates *p21* protein degradation assisted by HSPA8/HSC70; RNAi-knockdown of CHIP in A549 cells stabilizes *p21* and increases the number of SA- β -Gal-positive cells in response to ionizing radiation (Biswas et al., 2017). Indeed, CMA dysfunction caused by STUB1/CHIP deficiency induces premature senescence *in vivo*, as there is an increase in SA- β -Gal activity in renal cortex of kidneys from *Chip*^{-/-} mice, and *in vitro*, as *Chip*^{-/-} MEFs acquire replicative senescence sooner than wild type MEFs. Accordingly, *Chip*^{-/-} mice exhibit premature aging, displaying osteoporosis, skeletal muscle atrophy, reduced fat and a shortened life span compared to *Chip*^{+/+} mice (Min et al., 2008). Additional evidence supports the notion that STUB1/CHIP mediates CMA degradation of proteins whose accumulation could trigger cellular senescence. For example, STUB1/CHIP depletion by siRNA causes senescence in IMR90 fibroblasts and human foreskin fibroblasts. In this case, STUB1/CHIP is assisted by the chaperone HSP90 to target p14ARF for degradation in a LAMP2A-dependent manner, and hence prevents cellular senescence. Since no HSPA8/HSC70-interacting KFERQ motif was found in p14ARF, this mechanism differs from canonical CMA in that HSP90, rather than HSPA8/HSC70, delivers the target protein to LAMP2A (Han et al., 2017).

3.3. CMA dysfunction contributes to lipid accumulation, which could cause cellular senescence

CMA degrades proteins but not lipids. However, CMA facilitates lipolysis through the degradation of perlepin 2 and perlepin 3 (PLIN2 and PLIN3 respectively). PLIN2 and PLIN3 proteins have a KFERQ motif and function as a scaffold for lipid droplets. Once these proteins are degraded via CMA, then lipid droplets degradation by macroautophagy is allowed. LAMP2A deficient fibroblasts accumulate more and bigger lipid droplets, confirming a role of CMA in lipolysis (Kaushik and Cuervo, 2015). As mentioned before, old organisms have decreased CMA activity with aging caused by an altered lipid composition in the lysosomal membrane, causing a combination of less LAMP2A proteins and inefficient lateral mobilization (Rodríguez-Navarro et al., 2012). In this context, it is relevant to point out that replicative senescence is associated with changes in the lipidome content. Senescent human fibroblasts show an increase in the total content of triacylglycerols, which are the main components of lipid droplets, due to an increase of fatty acid uptake mediated by CD36 and a higher glycerolipid biosynthesis (Lizardo et al., 2017). We suggest that CMA dysfunction also contributes to the accumulation of triacylglycerols reinforcing the senescent phenotype; on the other hand, changes in the lipidome content during cellular senescence could foster CMA dysfunction by altering lysosomal membrane composition and hence interfering with LAMP2A function.

3.4. Dysfunctional CMA could contribute to cellular senescence in neurodegeneration

Some age-related pathologies, in particular neurodegenerative diseases such as Parkinson's diseases (PD), Alzheimer's diseases (AD) and Huntington's disease (HD) are characterized by the presence of abnormally accumulated proteins (Sala et al., 2017). The contribution of

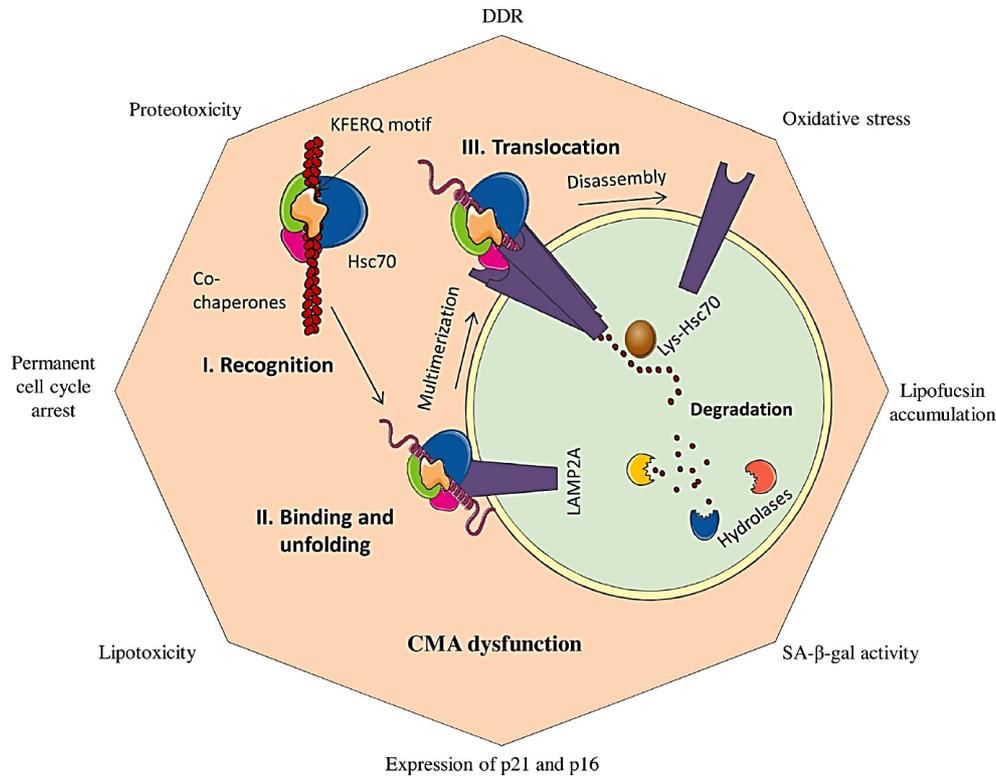


Fig. 3. Integrative connection between CMA and cellular senescence. Impairment of protein degradation by CMA is associated to the acquisition of several hallmarks of the senescent phenotype during both aging and neurodegeneration.

CMA dysfunction to neurodegeneration has been comprehensively reviewed by others (Liu et al., 2015; Xilouri and Stefanis, 2015). Here we focus on evidence supporting the notion that CMA dysfunction could contribute to cellular senescence in neurodegeneration.

In Parkinson's disease abnormal aggregates are known as Lewy bodies, and are composed primarily of α -synuclein and TAU proteins (Ishizawa et al., 2003). α -synuclein acquires multiple conformations including amyloidogenic oligomers (Iwai et al., 1995; Krassnig et al., 2015) and directly alters mitochondrial protein import through its binding to TOM20 receptor, leading to an increase in reactive oxygen species (Di Maio et al., 2016), which is known to induce senescence. α -synuclein is degraded mainly by CMA, so it accumulates when CMA function is impaired, as occurs in PD. For example, there is a decrease in both LAMP2A and HSP8/HSC70 in the *substantia nigra pars compacta* and amygdala of brains from PD patients (Alvarez-Erviti et al., 2010). Accordingly to the proposal that CMA dysfunction triggers cellular senescence, in cerebrospinal fluid from PD patients several features of senescence are found, like an increase in SA- β -gal activity (van Dijk et al., 2013) and the pro-inflammatory cytokines IL6 and IL- β , which are SASP components (Blum-Degen et al., 1995).

In Alzheimer's disease there is an extracellular deposition of β -amyloid ($A\beta$) peptide and intracellular hyper-phosphorylation of TAU. Abnormal aggregates that are formed by amyloid fibrils can be toxic to the cell, damaging cellular membranes and altering mitochondrial function through the inhibition of cytochrome c oxidase subunit 1 (also known as respiratory chain complex CcOX1), promoting an oxidizing environment (Hernandez-Zimbron et al., 2012; Jackson and Hewitt, 2016). Amyloid precursor protein (APP) contains a KFERQ motif, which

is necessary for its degradation by CMA; deletion of this motif impairs APP degradation and increases the production of $A\beta$ by the cleavage of APP by α/β secretase (Park et al., 2016). CMA also degrades other pathogenic proteins, such as TAU (Wang et al., 2009b) and Huntingtin (Bauer et al., 2010), supporting the notion that dysfunctional CMA contributes to neurodegeneration, possibly inducing cellular senescence. The latter is supported by the finding that exposure of primary neurons to $A\beta$ induces *p16/Cdkn2a* expression, and in a transgenic model of Alzheimer's disease, 5XFAD mice, there are more senescent hippocampal neurons (identified by the expression of *p16/Cdkn2a*) than in aged match wild type mice (Wei et al., 2016). Cellular senescence in the brain also occurs in humans, as there are more senescent astrocytes, identified by an increase of p16/CDKN2A, the metalloproteinase MMP-1/collagenase (a commonly SASP component), and SA- β -gal activity, in brains from humans 78–90 years compared to young, and in cortex from AD patients compared to cortex from aged match brains. Also in astrocytes, exposure to $A\beta$ induces cellular senescence (Bhat et al., 2012).

We propose that CMA impairment with age contributes to neurodegeneration by causing abnormal protein aggregation and, as a consequence, cellular senescence.

4. Conclusions

So far, advancements in our understanding of the changes that occur in the proteolytic systems during cellular senescence have focused on macroautophagy and the proteasome, leaving aside protein degradation via CMA. Nonetheless, here we present sufficient evidence supporting

the proposal that defects in CMA activity contribute to the onset of cellular senescence, by triggering DDR, SA- β -gal activity, expression of p21/CDKN1A, p16/CDKN2A and lipofuscin accumulation (Fig. 3), both during physiological aging and during pathogenesis such as neurodegeneration. An experimental demonstration of the role of CMA during cellular senescence is necessary, but if proved true, it will contribute to develop suitable strategies to prevent the accumulation of senescent cells and ameliorate physiological ageing and neurodegeneration.

Acknowledgements

Funding was provided by PAPIIT/UNAM IN206015, CONACyT CB2013-220515/F-921, and Fundación Miguel Alemán, A.C. to SCO. CONACyT fellowships were awarded to DMB (588372) and EGS (586932). DMB is student of the “Doctorado en Ciencias Bioquímicas, UNAM”. EGS is student of the “Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM”. We acknowledge Dr. Beatriz Aguilar for her technical support.

References

- Alvarez-Erviti, L., Rodríguez-Oroz, M.C., Cooper, J.M., Caballero, C., Ferrer, I., Obeso, J.A., Schapira, A.H., 2010. Chaperone-Mediated Autophagy Markers in Parkinson Disease Brains. *Arch. Neurol.* 67 (12), 1464–1472. <http://dx.doi.org/10.1001/archneurol.2010.198>.
- Arndt, V., Dick, N., Tawo, R., Dreiseidler, M., Wenzel, D., Hesse, M., Fürst, D.O., Saftig, P., Saint, R., Fleischmann, B.K., Hoch, M., Höhfeld, J., 2010. Chaperone-assisted selective autophagy is essential for muscle maintenance. *Curr. Biol.* 20, 143–148. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2009.11.022>.
- Baker, D.J., Wijshak, T., Tchkonina, T., Lebrasseur, N.K., Childs, B.G., Van De Sluis, B., Kirkland, J.L., Van Deursen, J.M., 2011. Ageing-associated disorders. *Nature* 479, 232–236. <http://dx.doi.org/10.1038/nature10600>.
- Baker, D.J., Childs, B.G., Durik, M., Wijers, M.E., Sieben, C.J., Zhong, J.A., Saltness, R., Jeganathan, K.B., Verzosa, G.C., Pezeshki, A., Khazaie, K., Miller, J.D., van Deursen, J.M., 2016. Naturally occurring p16Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* 530, 184–189. <http://dx.doi.org/10.1038/nature16932>.
- Bandyopadhyay, U., Kaushik, S., Varticovski, L., Cuervo, A.M., 2008. The chaperone-mediated autophagy receptor organizes in dynamic protein complexes at the lysosomal membrane. *Mol. Cell. Biol.* 28, 5747–5763. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.02070-07>.
- Bauer, P.O., Goswami, A., Wong, H.K., Okuno, M., Kurosawa, M., Yamada, M., Miyazaki, H., Matsumoto, G., Kino, Y., Nagai, Y., Nukina, N., 2010. Harnessing chaperone-mediated autophagy for the selective degradation of mutant huntingtin protein. *Nat. Biotechnol.* 28. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1608>.
- Bento, C.F., Renna, M., Ghislat, G., Puri, C., Ashkenazi, A., Vicinanza, M., Menzies, F.M., Rubinsztein, D.C., 2016. Mammalian autophagy: how does it work? *Annu. Rev. Biochem.* 85, 685–713. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014556>.
- Bhat, R., Crowe, E.P., Bitto, A., Moh, M., Katsetos, C.D., Garcia, F.U., Johnson, F.B., Trojanowski, J.Q., Sell, C., Torres, C., 2012. Astrocyte senescence as a component of Alzheimer's disease. *PLoS One* 7, 1–10. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0045069>.
- Biswas, K., Sarkar, S., Du, K., Brautigan, D.L., Abbas, T., Lamer, J.M., 2017. The E3 ligase CHIP mediates p21 degradation to maintain radioresistance. *Mol. Cancer Res.* 70, 1–10. <http://dx.doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-16-0466>.
- Blasco, M., Lee, H.W., Hande, M.P., Samper, E., Lansdorf, P.M., DePinho, R.A., Greider, C.W., 1997. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* 91, 25–34. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(01\)80066-4](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(01)80066-4) [pii].
- Blum-Degena, D., Müller, T., Kuhn, W., Gerlach, M., Pruntek, H., Riederer, P., 1995. Interleukin-1 β and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. *Neurosci. Lett.* 202, 17–20. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-3940\(95\)12192-7](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3940(95)12192-7).
- Burd, C.E., Sorrentino, J.A., Clark, K.S., Darr, D.B., Krishnamurthy, J., Deal, A.M., Bardeesy, N., Castrillon, D.H., Beach, D.H., Sharpless, N.E., 2013. Monitoring tumorigenesis and senescence in vivo with a p16 INK4a-luciferase model. *Cell* 152, 340–351. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.010>.
- Capparelli, C., Chiavarina, B., Whitaker-Menezes, D., Pestell, T.G., Pestell, R.G., Hult, J., Andò, S., Howell, A., Martinez-Outschoorn, U.E., Sotgia, F., Lisanti, M.P., 2012. CDK inhibitors (p16/p19/p21) induce senescence and autophagy in cancer-associated fibroblasts, fueling tumor growth via paracrine interactions, without an increase in neo-angiogenesis. *Cell Cycle* 11, 3599–3610. <http://dx.doi.org/10.4161/cc.21884>.
- Chainiaux, F., Magalhaes, J.-P., Eliaers, F., Remacle, J., Toussaint, O., 2002. UVB-induced premature senescence of human diploid skin fibroblasts. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34, 1331–1339. [http://dx.doi.org/10.1016/S1357-2725\(02\)00022-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1357-2725(02)00022-5).
- Chang, J., Wang, Y., Shao, L., Laberge, R.-M., Demaria, M., Campisi, J., Janakiraman, K., Sharpless, N.E., Ding, S., Feng, W., Luo, Y., Wang, X., Aykin-Burns, N., Krager, K., Ponnappan, U., Hauer-Jensen, M., Meng, A., Zhou, D., 2015. Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat. Med.* 22, 78–83. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.4010>.
- Chiang, H., Terlecky, Plant, C., Dice, J., 1989. A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science* (80-) 246, 382–385. <http://dx.doi.org/10.1126/science.2799391>.
- Childs, B.G., Durik, M., Baker, D.J., van Deursen, J.M., 2015. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat. Med.* 21, 1424–1435. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.4000>.
- Coppé, J.P., Desprez, P.Y., Krtolica, A., Campisi, J., 2010a. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu. Rev. Pathol.* 5, 99–118. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-pathol-121806-102144>.
- Coppé, J.P., Patil, C.K., Rodier, F., Krtolica, A., Beauséjour, C.M., Parrinello, S., Hodgson, J.G., Chin, K., Desprez, P.Y., Campisi, J., 2010b. A human-like senescence-associated secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on physiological oxygen. *PLoS One*. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0009188>. 5.
- Correia-Melo, C., Hewitt, G., Passos, J.F., 2014. Telomeres, oxidative stress and inflammatory factors: partners in cellular senescence? *Longev. Heal.* 3, 1. <http://dx.doi.org/10.1186/2046-2395-3-1>.
- Cuervo, A.M., Dice, J.F., 2000. Age-related decline in chaperone-mediated autophagy. *J. Biol. Chem.* 275, 31505–31513. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M002102200>.
- Cuervo, A.M., Wong, E., 2014. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Res.* 24, 92–104. <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2013.153>.
- Debaq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J.D., Campisi, J., Toussaint, O., 2009. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- β gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat. Protoc.* 4, 1798–1806. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2009.191>.
- Di Maio, R., Barrett, P.J., Hoffman, E.K., Barrett, C.W., Zharikov, A., Borah, A., Hu, X., McCoy, J., Chu, C.T., Burton, E.A., Hastings, T.G., Greenamyre, J.T., 2016. a-Synuclein binds to TOM20 and inhibits mitochondrial protein import in Parkinson's disease. *Sci. Transl. Med.* 8, 342ra78. <http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf3634>.
- Di Micco, R., Cicalese, A., Fumagalli, M., Dobrev, M., Verrecchia, A., Pelicci, P.G., Di Fagagna, F.D.A., 2008. DNA damage response activation in mouse embryonic fibroblasts undergoing replicative senescence and following spontaneous immortalization. *Cell Cycle* 7, 3601–3606. <http://dx.doi.org/10.4161/cc.7.22.7152>.
- Dice, J.F., 1982. Altered degradation of proteins microinjected into senescent human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 257, 14624–14627.
- Dou, Z., Xu, C., Donahue, G., Shimi, T., Pan, J.-A., Zhu, J., Ivanov, A., Capell, B.C., Drake, A.M., Shah, P.P., Catanzaro, J.M., Daniel Ricketts, M., Lamark, T., Adam, S.A., Marmorstein, R., Zong, W.-X., Johansen, T., Goldman, R.D., Adams, P.D., Berger, S.L., 2015. Autophagy mediates degradation of nuclear lamina. *Nature* 527, 105–109. <http://dx.doi.org/10.1038/nature15548>.
- Dupont, N., Jiang, S., Pili, M., Ornatowski, W., Bhattacharya, D., Deretic, V., 2011. Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1 β . *EMBO J.* 30, 4701–4711. <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2011.398>.
- Ferreira, J.V., Fofo, H., Bejarano, E., Bento, C.F., Ramalho, J.S., Giro, H., Pereira, P., 2013. STUB1/CHIP is required for HIF1A degradation by chaperone-mediated autophagy. *Autophagy* 9, 1349–1366. <http://dx.doi.org/10.4161/auto.25190>.
- Furuta, A., Wakabayashi, K., Haratake, J., Kikuchi, H., Kabuta, T., Mori, F., Tokonami, F., Katsumi, Y., Tanioka, F., Uchiyama, Y., Nishino, I., Wada, K., 2013. Lysosomal storage and advanced senescence in the brain of LAMP-2-deficient Danon disease. *Acta Neuropathol.* 125, 459–461. <http://dx.doi.org/10.1007/s00401-012-1075-4>.
- Georgakopoulou, E.A., Tsimaritou, K., Evangelou, K., Fernandez-Marcos, P.J., Zoumpourlis, V., Trougakos, I.P., Kletsas, D., Bartek, J., Serrano, M., Gorgoulis, V.G., 2013. Specific lipofuscin staining as a novel biomarker to detect replicative and stress-induced senescence. A method applicable in cryo-preserved and archival tissues. *Ageing (Albany, N.Y.)* 5, 37–50. <http://dx.doi.org/10.18632/aging.100527>.
- Han, S.Y., Ko, A., Kitano, H., Choi, C.H., Lee, M.S., Seo, J., Fukuoka, J., Kim, S.Y., Hewitt, S.M., Chung, J.Y., Song, J., 2017. Molecular chaperone HSP90 is necessary to prevent cellular senescence via lysosomal degradation of p14ARF. *Cancer Res.* 77, 343–354. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0613>.
- He, S., Sharpless, N.E., 2017. Review senescence in health and disease. *Cell* 169, 1000–1011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.015>.
- Hernandez-Zimbron, L.F., Luna-Muñoz, J., Mena, R., Vazquez-Ramirez, R., Kubli-Garfias, C., Cribbs, D.H., Manoutcharian, K., Gevorkian, G., 2012. Amyloid- β peptide binds to cytochrome C oxidase subunit 1. *PLoS One* 7, 29–31. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0042344>.
- Hubbi, M.E., Semenza, G.L., 2015. An essential role for chaperone-mediated autophagy in cell cycle progression. *Autophagy* 11, 850–851. <http://dx.doi.org/10.1080/15548627.2015.1037063>.
- Hubbi, M.E., Gilkes, D.M., Hu, H., Kshitiz Ahmed, I., Semenza, G.L., 2014. Cyclin-dependent kinases regulate lysosomal degradation of hypoxia-inducible factor 1 α to promote cell-cycle progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, E3325–34. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1412840111>.
- Ishizawa, T., Mattila, P., Davies, P., Wang, D., Dickson, D.W., 2003. Colocalization of tau and alpha-synuclein epitopes in Lewy bodies. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 62, 389–397. <http://dx.doi.org/10.1093/jnen/62.4.389>.
- Iwai, A., Yoshimoto, M., Masliah, E., Saitoh, T., 1995. Non-AP component of Alzheimer's disease amyloid (NAC) is amyloidogenic. *Biochemistry* 10139–10145. <http://dx.doi.org/10.1021/bi00032a006>.
- Jackson, M.P., Hewitt, E.W., 2016. Cellular proteostasis: degradation of misfolded proteins by lysosomes. *Essays Biochem.* 60, 173–180. <http://dx.doi.org/10.1042/EBC20160005>.
- Jeon, O.H., Kim, C., Laberge, R., Demaria, M., Rathod, S., Vasserot, A.P., Chung, J.W., Kim, D.H., Poon, Y., David, N., Baker, D.J., Deursen, J.M., Campisi, Van, Elisseeff, J., 2017. Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. *Nat. Publ. Gr.* 23, 775–781. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.4324>.
- Jung, Y., Qian, Y., Chen, X., 2010. Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity. *Cell. Signal.* 22, 1003–1012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cel.2010.03.005>.

- org/10.1016/j.cel.2010.01.013.
- Kang, C., Elledge, S.J., 2016. How autophagy both activates and inhibits cellular senescence. *Autophagy* 12, 898–899. <http://dx.doi.org/10.1080/15548627.2015.1121361>.
- Kang, H.T., Lee, K.B., Kim, S.Y., Choi, H.R., Park, S.C., 2011. Autophagy impairment induces premature senescence in primary human fibroblasts. *PLoS One* 6, 1–12. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0023367>.
- Kang, C., Xu, Q., Martin, T.D., Li, M.Z., Demaria, M., Aron, L., Elledge, S.J., 2015a. The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4. *Science* 16, 1–26. <http://dx.doi.org/10.1037/emo0000122>.
- Kang, C., Xu, Q., Martin, T.D., Li, M.Z., Demaria, M., Aron, L., Lu, T., Yankner, B.A., Campisi, J., Elledge, S.J., 2015b. The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4. *Science* (80-) 349, aaa5612. <http://dx.doi.org/10.1126/science.aaa5612>.
- Kaur, J., Debnath, J., 2015. Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 461–472. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm4024>.
- Kaushik, S., Cuervo, A.M., 2012. Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol.* 22, 407–417. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2012.05.006>.
- Kaushik, S., Cuervo, A.M., 2015. Degradation of lipid droplet-associated proteins by chaperone-mediated autophagy facilitates lipolysis. *Nat. Cell Biol.* 17, 759–770. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb3166>.
- Kaushik, S., Massey, A.C., Cuervo, A.M., 2006. Lysosome membrane lipid microdomains: novel regulators of chaperone-mediated autophagy. *EMBO J.* 25, 3921–3933. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7601283>.
- Kiffin, R., Christian, C., Knecht, E., Cuervo, A., 2004. Activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress. *Mol. Biol. Cell* 16, 4829–4840. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E04>.
- Kiffin, R., Kaushik, S., Zeng, M., Bandyopadhyay, U., Zhang, C., Massey, A.C., Martinez-Vicente, M., Cuervo, A.M., 2007. Altered dynamics of the lysosomal receptor for chaperone-mediated autophagy with age. *J. Cell Sci.* 120, 782–791. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.001073>.
- Klionsky, D.J., Schulman, B.A., 2014. Dynamic regulation of macroautophagy by distinctive ubiquitin-like proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21, 336–345. <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.2787>.
- Koshiji, M., Kageyama, Y., Pete, E.A., Horikawa, I., Barrett, J.C., Huang, L.E., 2004. HIF-1 α induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc. *EMBO J.* 23, 1949–1956. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7600196>.
- Krassnig, S., Schweitzer, C., Taub, N., Havas, D., Auer, E., Flunkert, S., Schreiber, W., Hutter-Paier, B., Windisch, M., 2015. Influence of lentiviral??-synuclein over-expression in the hippocampus of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease on amyloid precursor protein metabolism and pathology. *Neurodegener. Dis.* 15, 243–257. <http://dx.doi.org/10.1159/000430952>.
- López-otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., 2013. Europe PMC funders group the hallmarks of aging. *Cell* 153, 1194–1217. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>.
- Liu, X., Huang, S., Wang, X., Tang, B., Li, W., Mao, Z., 2015. Chaperone-mediated autophagy and neurodegeneration: connections, mechanisms, and therapeutic implications. *Neurosci. Bull.* 31, 407–415. <http://dx.doi.org/10.1007/s12264-015-1542-8>.
- Lizardo, D.Y., Lin, Y.-L., Gokcumen, O., Atilla-Gokcumen, G.E., 2017. Regulation of lipids is central to replicative senescence. *Mol. Biosyst.* 13, 498–509. <http://dx.doi.org/10.1039/C6MB00842A>.
- Lu, T., Finkel, T., 2008. Free radicals and senescence. *Exp. Cell Res.* 314, 1918–1922. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.01.011>.
- Lukasova, E., Kovarik, A., Bacikova, A., Falk, M., Kozubek, S., 2016. Loss of lamin B receptor is necessary to induce cellular senescence. *Biochem. J.* <http://dx.doi.org/10.1042/BCJ20160459>.
- Luo, Y., Zou, P., Zou, J., Wang, J., Zhou, D., Liu, L., 2011. Autophagy regulates ROS-induced cellular senescence via p21 in a p38 MAPK?? dependent manner. *Exp. Gerontol.* 46, 860–867. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2011.07.005>.
- Lv, L., Li, D., Zhao, D., Lin, R., Chu, Y., Zhang, H., Zha, Z., Liu, Y., Li, Z., Xu, Y., Wang, G., Huang, Y., Xiong, Y., Guan, K.L., Lei, Q.Y., 2011. Acetylation targets the M2 isoform of pyruvate kinase for degradation through chaperone-mediated autophagy and promotes tumor growth. *Mol. Cell* 42, 719–730. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2011.04.025>.
- Maciel-Barón, L.Á., Moreno-Blas, D., Morales-Rosales, S.L., González-Puertos, V.Y., López-Diazguerrero, N.E., Torres, C., Castro-Obrégón, S., Konigsberg, M., 2017. Cellular senescence, neurological function and redox state. *Antioxid. Redox Signal.* 7112. <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2017.7112>.
- Mas-Bargues, C., Viña-Almunia, J., Inglés, M., Sanz-Ros, J., Gambini, J., Ibáñez-Cabellos, J.S., García-Giménez, J.L., Viña, J., Borrás, C., 2017. Role of p16 INK4a and BMI-1 in oxidative stress-induced premature senescence in human dental pulp stem cells. *Redox Biol.* 12, 690–698. <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2017.04.002>.
- Min, J.-N., Whaley, R.A., Sharpless, N.E., Lockyer, P., Portbury, A.L., Patterson, C., 2008. CHIP deficiency decreases longevity, with accelerated aging phenotypes accompanied by altered protein quality control. *Mol. Cell Biol.* 28, 4018–4025. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.00296-08>.
- Mizushima, N., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., 2011. The role of atg proteins in autophagosome formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 107–132. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154005>.
- Muñoz-Espín, D., Serrano, M., 2014. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 482–496. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3823>.
- Muñoz-Espín, D., Cañamero, M., Maraver, A., Gómez-López, G., Contreras, J., Murillo-Cuesta, S., Rodríguez-Baeza, A., Varela-Nieto, I., Ruberte, J., Collado, M., Serrano, M., 2013. XProgrammed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell* 155. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.019>.
- Murata, S., Chiba, T., Tanaka, K., 2003. CHIP: A quality-control E3 ligase collaborating with molecular chaperones. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35, 572–578. [http://dx.doi.org/10.1016/S1357-2725\(02\)00394-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1357-2725(02)00394-1).
- Nagano, T., Nakano, M., Nakashima, A., Onishi, K., Yamao, S., Enari, M., Kikkawa, U., Kamada, S., 2016. Identification of cellular senescence-specific genes by comparative transcriptomics. *Sci. Rep.* 6, 31758. <http://dx.doi.org/10.1038/srep31758>.
- Narita, M., Núñez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A.W., Hearn, S.A., Spector, D.L., Hamon, G.J., Lowe, S.W., 2003. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 113, 703–716. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00401-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00401-X).
- Narita, M., Young, A.R.J., Arakawa, S., Samarajiwa, S.A., Nakashima, T., Yoshida, S., Hong, S., Berry, L.S., Reichelt, S., Ferreira, M., Tavare, S., Inoki, K., Shimizu, S., Narita, M., 2011. Spatial coupling of mTOR and autophagy augments secretory phenotypes. *Science* (80-) 332, 966–970. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1205407>.
- Ohsumi, Y., 2014. Historical landmarks of autophagy research. *Cell Res.* 24, 9–23. <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2013.169>.
- Onodera, J., Ohsumi, Y., 2005. Autophagy is required for maintenance of amino acid levels and protein synthesis under nitrogen starvation. *J. Biol. Chem.* 280, 31582–31586. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M506736200>.
- Park, C., Suh, Y., Cuervo, A.M., 2015. Regulated degradation of Chk1 by chaperone-mediated autophagy in response to DNA damage. *Nat. Commun.* 6, 6823. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms7823>.
- Park, J.S., Kim, D.H., Yoon, S.Y., 2016. Regulation of amyloid precursor protein processing by its KFERQ motif. *BMB Rep.* 49, 337–342. <http://dx.doi.org/10.5483/BMBRep.2016.49.6.212>.
- Passos, J.F., Von Zglinicki, T., 2006. Oxygen free radicals in cell senescence: are they signal transducers? *Free Radic. Res.* 40, 1277–1283. <http://dx.doi.org/10.1080/10715760600917151>.
- Passos, J.F., Nelson, G., Wang, C., Richter, T., Simillion, C., Proctor, C.J., Miwa, S., Olijslagers, S., Hallinan, J., Wipat, A., Saretzki, G., Rudolph, K.L., Kirkwood, T.B.L., von Zglinicki, T., 2010. Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Mol. Syst. Biol.* 6, 1–14. <http://dx.doi.org/10.1038/msb.2010.5>.
- Rodier, F., Campisi, J., 2011. Four faces of cellular senescence. *J. Cell Biol.* 192, 547–556. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201009094>.
- Rodríguez-Navarro, J.A., Kaushik, S., Koga, H., Dall'Armi, C., Shui, G., Wenk, M.R., Di Paolo, G., Cuervo, A.M., 2012. Inhibitory effect of dietary lipids on chaperone-mediated autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, E705–E714. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1113036109>.
- Rothaug, M., Stroobants, S., Schweizer, M., Peters, J., Zunke, F., Allerding, M., Hooge, R.D., Saftig, P., Blanz, J., 2015. LAMP-2 deficiency leads to hippocampal dysfunction but normal clearance of neuronal substrates of chaperone-mediated autophagy in a mouse model for Danon disease. *Acta Neuropathol Commun* 1–17. <http://dx.doi.org/10.1186/s40478-014-0182-y>.
- Saha, T., 2012. LAMP2A overexpression in breast tumors promotes cancer cell survival via chaperone-mediated autophagy. *Autophagy* 8, 1643–1656. <http://dx.doi.org/10.4161/auto.21654>.
- Sahu, R., Kaushik, S., Clement, C.C., Cannizzo, E.S., Scharf, B., Follenzi, A., Potalicchio, I., Nieves, E., Cuervo, A.M., Santambrogio, L., 2011. Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes. *Dev. Cell* 20, 131–139. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2010.12.003>.
- Sala, A.J., Bott, L.C., Morimoto, R.I., 2017. Shaping proteostasis at the cellular, tissue, and organismal level. *J. Cell Biol.* 201612111. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201612111>.
- Salvador, N., Aguado, C., Horst, M., Knecht, E., 2000. Import of cytosolic protein into lysosomes by chaperone-mediated autophagy depends on its folding state. *J. Biol. Chem.* 275, 27447–27456.
- Sasaki, M., Miyakoshi, M., Sato, Y., Nakanuma, Y., 2010. Autophagy mediates the process of cellular senescence characterizing bile duct damages in primary biliary cirrhosis. *Lab. Invest.* 90, 835–843. <http://dx.doi.org/10.1038/labinvest.2010.56>.
- Satyanarayana, A., Hilton, M.B., Kaldis, P., 2008. P21 inhibits cdk1 in the absence of cdk2 to maintain the G1/S phase DNA damage checkpoint. *Mol. Biol. Cell* 19, 65–77. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E07>.
- Schneider, J.L., Villarroya, J., Diaz-Carretero, A., Patel, B., Urbanska, A.M., Thi, M.M., Villarroya, F., Santambrogio, L., Cuervo, A.M., 2015. Loss of hepatic chaperone-mediated autophagy accelerates proteostasis failure in aging. *Aging Cell* 14, 249–264. <http://dx.doi.org/10.1111/acel.12310>.
- Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., Lowe, S.W., 1997. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16(INK4a). *Cell* 88, 593–602. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81902-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81902-9).
- Sherr, C.J., DePinho, R.A., 2000. Cellular senescence: minireview mitotic clock or culture shock? *Cell* 102, 407–410. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00046-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00046-5).
- Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, K., Cuervo, A.M., Czaja, M.J., 2009. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 458, 1131–1135. <http://dx.doi.org/10.1038/nature07976>.
- Storer, M., Mas, A., Robert-Moreno, A., Pecoraro, M., Ortells, M.C., Di Giacomo, V., Yosef, R., Pilpel, N., Krizhanovsky, V., Sharpe, J., Keyes, W.M., 2013. XSenescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell* 155, 1119–1130. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.041>.
- Thompson, L.M., Aiken, C.T., Kaltentbach, L.S., Agrawal, N., Illes, K., Khoshnan, A., Martinez-Vicente, M., Arrasate, M., O'Rourke, J.G., Khashwji, H., Lukacsovich, T., Zhu, Y.Z., Lau, A.L., Massey, A., Hayden, M.R., Zeitlin, S.O., Finkbeiner, S., Green, K.N., LaFerla, F.M., Bates, G., Huang, L., Patterson, P.H., Lo, D.C., Cuervo, A.M., Marsh, J.L., Steffan, J.S., 2009. IKK phosphorylates Huntingtin and targets it for

- degradation by the proteasome and lysosome. *J. Cell Biol.* 187, 1083–1099. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200909067>.
- Unterlugauer, H., Micutkova, L., Lindner, H., Sarg, B., Hernebring, M., Nystrom, T., Jansen-Dürr, P., 2009. Identification of Hsc70 as target for AGE modification in senescent human fibroblasts. *Biogerontology* 10, 299–309. <http://dx.doi.org/10.1007/s10522-008-9193-z>.
- van Deursen, J.M., 2014. The role of senescent cells in ageing. *Nature* 509, 439–446. <http://dx.doi.org/10.1038/nature13193>.
- van Dijk, K.D., Persichetti, E., Chiasserini, D., Eusebi, P., Beccari, T., Calabresi, P., Berendse, H.W., Parnetti, L., van de Berg, W.D.J., 2013. Changes in endolysosomal enzyme activities in cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 28, 747–754. <http://dx.doi.org/10.1002/mds.25495>.
- Wang, C., Jurk, D., Maddick, M., Nelson, G., Martin-rui, C., Von Zglinicki, T., 2009a. DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. *Aging Cell* 8, 311–323. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1474-9726.2009.00481.x>.
- Wang, Y., Martinez-Vicente, M., Krüger, U., Kaushik, S., Wong, E., Mandelkow, E.M., Cuervo, A.M., Mandelkow, E., 2009b. Tau fragmentation, aggregation and clearance: the dual role of lysosomal processing. *Hum. Mol. Genet.* 18, 4153–4170. <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddp367>.
- Wei, Z., Chen, X.C., Song, Y., Pan, X.D., Dai, X.M., Zhang, J., Cui, X.L., Wu, X.L., Zhu, Y.G., 2016. Amyloid?? protein aggravates neuronal senescence and cognitive deficits in 5XFAD mouse model of Alzheimer??s disease. *Chin. Med. J. (Engl.)* 129, 1835–1844. <http://dx.doi.org/10.4103/0366-6999.186646>.
- Xie, Z., Klionsky, D.J., 2007. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat. Cell Biol.* 9, 1102–1109. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1007-1102>.
- Xilouri, M., Stefanis, L., 2015. Molecular and Cellular Neuroscience Chaperone mediated autophagy to the rescue: a new-fangled target for the treatment of neurodegenerative diseases. *Mol. Cell. Neurosci.* 66, 29–36. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcn.2015.01.003>.
- Xilouri, M., Stefanis, L., 2016. Chaperone mediated autophagy in aging: starve to prosper. *Ageing Res. Rev.* 32, 13–21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2016.07.001>.
- Xilouri, M., Brekk, O.R., Polissidis, A., Chrysanthou-Piterou, M., Kloukina, L., Stefanis, L., 2016. Impairment of chaperone-mediated autophagy induces dopaminergic neurodegeneration in rats. *Autophagy* 12, 2230–2247. <http://dx.doi.org/10.1080/15548627.2016.1214777>.
- Zhang, L., Sun, Y., Fei, M., Tan, C., Wu, J., Zheng, J., Tang, J., Sun, W., Lv, Z., Bao, J., Xu, Q., Yu, H., 2014. Disruption of chaperone-mediated autophagy-dependent degradation of MEF2A by oxidative stress-induced lysosome destabilization. *Autophagy* 10, 1015–1035. <http://dx.doi.org/10.4161/auto.28477>.

Cortical neurons develop a senescence-like phenotype promoted by dysfunctional autophagy

Daniel Moreno-Blas¹, Elisa Gorostieta-Salas¹, Alexander Pommer-Alba¹, Gabriel Muciño-Hernández¹, Cristian Gerónimo-Olvera², Luis Angel Maciel-Barón³, Mina Konigsberg³, Lourdes Massieu², Susana Castro-Obregón¹

¹Departamento de Neurodesarrollo y Fisiología, División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Mexico City 04510, México

²Departamento de Neuropatología, División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Mexico City 04510, México

³Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Mexico City 09340, México

Correspondence to: Susana Castro-Obregón; email: scastro@ifc.unam.mx

Keywords: senescence, brain, neuron, autophagy, SASP (senescence-associated secretory phenotype)

Received: March 12, 2019

Accepted: August 9, 2019

Published: August 30, 2019

Copyright: Moreno-Blas et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

Senescent cells accumulate in various tissues and organs with aging altering surrounding tissue due to an active secretome, and at least in mice their elimination extends healthy lifespan and ameliorates several chronic diseases. Whether all cell types senesce, including post-mitotic cells, has been poorly described mainly because cellular senescence was defined as a permanent cell cycle arrest. Nevertheless, neurons with features of senescence have been described in old rodent and human brains. In this study we characterized an *in vitro* model useful to study the molecular basis of senescence of primary rat cortical cells that recapitulates senescent features described in brain aging. We found that in long-term cultures, rat primary cortical neurons displayed features of cellular senescence before glial cells did, and developed a functional senescence-associated secretory phenotype able to induce paracrine premature senescence of mouse embryonic fibroblasts but proliferation of rat glial cells. Functional autophagy seems to prevent neuronal senescence, as we observed an autophagic flux reduction in senescent neurons both *in vitro* and *in vivo*, and autophagy impairment induced cortical cell senescence while autophagy stimulation inhibited it. Our findings suggest that aging-associated dysfunctional autophagy contributes to senescence transition also in neuronal cells.

INTRODUCTION

Aging is accompanied by a wide range of symptoms that reduce health span, such as cardiovascular dysfunction, osteoporosis, neurodegeneration and cancer, among other diseases. Amelioration of those symptoms has been achieved after pharmacological interventions using a novel class of drugs termed senolytics. These compounds clear senescent cells that

accumulate late in life both in normal tissues and especially in those affected by age-related pathologies [1]. Nevertheless, senescent cells are harmful only when they persist, since transient senescent cells, which are eliminated by effector immune cells, contribute to wound healing, regeneration, immunity and even morphogenesis during development [2]. Therefore, it is fundamental to understand the molecular mechanisms of senescence establishment and maintenance.

Cellular senescence is a phenotype characterized by a durable cell cycle arrest (*i.e.* cells do not respond to mitogens) and a flattened and vacuolated morphology with stress granules collection. Even though there is no single marker of senescence, some of the most common features observed are: activation of the lysosomal enzyme senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal); persistent DNA damage response detected by γ H2AX foci; expression of tumor suppressors p21^{CIP1/WAF1} (encoded by *Cdkn1a*) and/or p16^{INK4A} (encoded by *Cdkn2a*); lipofuscin accumulation [3]; and nuclear deformation associated with nuclear envelope proteins degradation [4]. The most important activity of senescent cells is the secretion of a set of molecules, known as the senescence-associated secretory phenotype (SASP) that, depending on the physiological context, can be either beneficial or harmful. In early stages senescent cells secrete cytokines that promote the migration and infiltration of effector immune cells, as well as growth factors and proteases that facilitate tissue repair and remodeling. Yet, persisting signaling contributes to chronic inflammation, a hallmark of aging and a major contributor to age-related dysfunctions. SASP molecules also have an autocrine role, fostering the senescent phenotype, and a paracrine role inducing senescence in surrounding cells [5], inflammation and tumorigenesis [6, 7].

Autophagy is a catabolic process that degrades intracellular components, like proteins and damaged organelles, including mitochondria, through lysosomes. Similar to senescence, it is induced in response to stressful stimuli, therefore both senescence and autophagy are often observed simultaneously. The interplay between autophagy and senescence requires further investigation, since autophagy has been implicated in both promoting and inhibiting cellular senescence. While autophagy inhibition promotes senescence in normal proliferating cells [8], autophagy inhibition delays oncogene-induced senescence and the synthesis of SASP components [9]. A possible explanation for the opposing role of autophagy over senescence is that it could engulf alternative targets that regulate cellular senescence in opposite manners. For example, the stability of the transcription factor GATA4, a key activator of SASP genes, is regulated by autophagy. Upon senescence induction, GATA4 escapes autophagic degradation because its interaction with p62/SQSTM1 (an autophagy cargo receptor) decreases, leading to GATA4 accumulation [10]. On the other hand, during oncogene-induced senescence, autophagy fosters the SASP through a specialized compartment known as the TOR-autophagy spatial coupling compartment (TASCC), where mTOR localizes at the surface of autolysosomes, which are

surrounded by endoplasmic reticulum; a flux of recycled amino acids and metabolites released from the autolysosomes are used by mTORC1 for supporting the synthesis of SASP factors, hence facilitating senescence [11]. Therefore, selective autophagy actively suppresses cellular senescence through the degradation of GATA4, whereas autophagic degradation of other proteins (perhaps long-lived proteins), facilitates the SASP [12].

The traditional view of senescence as a specific phenomenon where a proliferation-competent cell undergoes permanent growth arrest, has limited the study of senescence of post-mitotic cells. Accordingly, the limited studies on cellular senescence in the brain have mostly focused on glial cells [13]. Nonetheless, some senescent markers have been described in several studies of both physiological aging and neurodegenerative diseases [14]. For example, cortical and Purkinje neurons show several senescence features like SA- β -gal activity, lipofuscin accumulation, γ H2AX and macro-H2A foci, and IL6 expression, all in a p21^{CIP1/WAF1}-dependent manner [15]. Interestingly, human neurons might also senesce, since there is expression of *p16/Cdkn2a* in pyramidal neurons in the prefrontal cortex from human brains of people over 77 years old [10]. We are interested in understanding the molecular basis for neuronal senescence, because we hypothesize that when senescent neurons persist in the brain, they contribute to cognitive decline by impairing synaptic function, inducing paracrine senescence and chronic inflammation.

While cellular senescence of mitotic cells is induced mainly by stressful stimuli (most of them inducing DNA damage), telomere attrition during cell division, oncogene activation or developmental cues [2], the molecular mechanisms that induce post-mitotic cells senescence are less understood. Also, whether autophagy regulates senescence in any direction in post-mitotic cells is completely unknown. Several groups have observed that neuronal cells acquire some senescent features *in vitro*, providing a very helpful system to study the molecular basis of neuronal senescence. For example, primary cortical, hippocampal and cerebellar granule neurons become SA- β -gal-positive over time [16-20]. However, these studies were limited to the detection of SA- β -gal activity, which could be misleading [21]. Recent *in vitro* studies confirmed the presence of additional senescent features, including γ H2AX foci in neurons from mouse neuroglial co-cultures maintained up to 27 days *in vitro* (DII) [22]. Taken together, these reports support the notion that cultured neurons *in vitro* are capable of undergoing cellular senescence with the same features that occur *in vivo*.

For senescent neurons to contribute to chronic inflammation and paracrine senescence, they must establish a senescent phenotype including the SASP. Paracrine senescence has been demonstrated to occur in mouse embryonic fibroblast exposed to conditioned media from senescent fibroblasts [5]. In this work we developed an *in vitro* model of neuronal senescence that recapitulates *in vivo* senescence markers, and secreted molecules able to induce paracrine glial proliferation as well as premature senescence in mouse embryonic fibroblasts, pointing towards a neuronal SASP. We found that senescent cortical cells secrete C-C motif chemokine 2, also known as monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), a known SASP factor able to induce paracrine senescence [23]. Interestingly, we found that rat primary cortical neurons displayed features of cellular senescence before glial cells did. As reported for proliferating cells, functional autophagy, perhaps selective, seems to prevent neuronal senescence, as we observed autophagic flux impairment. Accordingly, we observed more senescent cortical cells when autophagy was impaired and less when it was stimulated. Our findings suggest that a dysfunctional autophagy contributes to senescence transition also in post-mitotic cells.

RESULTS

Primary cortical neurons acquire several senescent features after long-term culture.

To establish an *in vitro* model to study the transition of neurons from a non-dividing terminal differentiation state into senescence *in vitro*, prenatal rat cortical cells were cultured for up to 40 days *in vitro* (DIV). Since several reports indicate the presence of senescent glial cells in old brains [13], we considered that glial cells could become senescent and then promote paracrine neuronal senescence; hence, we allowed the proliferation of glial cells during the culture of primary cortical cells. During the first days of culture (6 DIV), neurons (expressing β III-TUBULIN) represented 96.8% (SD 2.2) of the cells with very few glial cells (expressing GFAP); due to proliferation of glial cells and some loss of neurons, by 26 DIV there were 51% (SD 6.9) neurons and 31% (SD 11.5) glial cells; and by 40 DIV 73% (SD 6.9) of the surviving cells were glial. The cells expressing β III-TUBULIN did not express GFAP. On average, the total number of cells along the culture remained similar (Supplementary Figure 1S). Without any further stressful stimuli, cortical cells became SA- β -gal-positive over time and accumulated lipofuscin detected by autofluorescence and by Sudan Black B staining, a lipophilic dye [24] (Figures 1A-B). SBB staining seems to be more sensitive than SA- β -gal activity. An increment in both SA- β -gal-positive and

lipofuscin accumulation was also confirmed in the cortex of old rat brains (Figures 1C-E).

Since different inducers of senescence in mitotic cells converge on the activation of the tumor suppressor p21^{CIP1/WAF1}, and indeed p21^{CIP1/WAF1} has been suggested to mediate neuronal senescence in old brains [15], we reasoned that even though post-mitotic cells already express some CDK inhibitors to exit the cell cycle, they could still need to induce its expression for a pro-senescent activity from this protein. Therefore, we analyzed its expression on neurons or glial cells at different times of culture. As shown in Figure 2, in primary culture of cortical cells incubated 26 DIV, neurons but not yet glial cells expressed higher levels of p21^{CIP1/WAF1}. The number of glial cells with elevated expression of p21^{CIP1/WAF1} increased until 40 DIV. This observation suggests that neurons acquire senescent features before glial cells. Interestingly, at 26 DIV p21^{CIP1/WAF1} is slightly enriched at the nuclear periphery. This could be related to the recent finding that altered nuclear export is a common hallmark of aging [25]. We confirmed p21^{CIP1/WAF1} expression is induced at transcriptional level in cortical cells at 26 DIV by qRT-PCR (Figure 2C).

Another hallmark of senescence is a persistent DNA damage response, commonly detected by the presence of γ H2AX foci. As shown in Figure 3A, neuronal cells accumulated γ H2AX foci at 26 DIV, accompanied by ruptures of DNA detected by Comet assay (Figure 3B). Even though we are not able to distinguish neurons from glial cells with this assay, it is conceivable that the nuclei with broken DNA come from neurons, since we observed that mainly neurons had γ H2AX foci; these observations suggest that neurons accumulate DNA damage leading to a persistent DNA damage response. At both 26 and 40 DIV, only a small proportion of GFAP expressing cells had γ H2AX foci. As expected, cortical neurons from old rat brains also contained more γ H2AX foci (Figure 3C).

Finally, since during oncogene-induced senescence, replicative senescence and senescence induced by DNA damaging drugs occur nuclear morphology abnormalities associated with nuclear envelope proteins loss [26], and depletion of Lamin-B1 or Lamin-A/C is sufficient to induce senescent features [4], we wondered whether also senescent post-mitotic cells, such as neurons, would manifest nuclear morphology deformations. As shown in Figure 4, indeed both *in vitro* and *in vivo* senescent neurons had irregular nuclear morphology with folds of the nuclear envelope forming intra-nuclear Lamin-A/C structures that protrude into the nucleoplasm. Very few astrocytes showed abnormal distribution of Lamin-A/C at 26 DIV, strengthening the

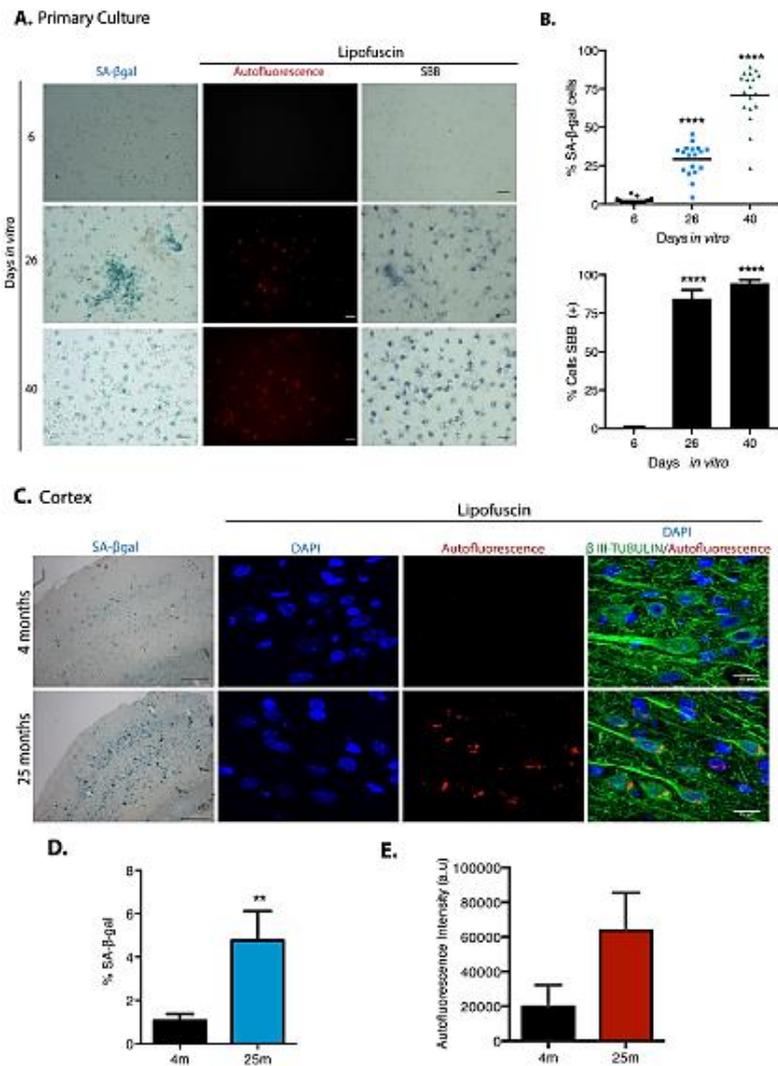


Figure 1. Cortical cells in long-term culture and in old rat brains had higher SA-β-gal activity and accumulated lipofuscin. (A) SA-β-gal activity or lipofuscin accumulation detected by autofluorescence or by Sudan Black B (SBB) staining were detected in primary rat cortical cells cultured for the indicated D/IV. Notice that cortical cells have higher SA-β-gal activity and lipofuscin from 26 D/IV. Images are representative of at least three independent experiments. Scales bar represent 100 μm. (B) Percentage of SA-β-gal or SBB positive cells in the cultures incubated at the indicated D/IV. Quantification was made using NIS Elements software. The mean of three independent experiments, each done by quintupled replicas, is graphed. Bars in graphs represent SEM. Two-way RM ANOVA analysis, with Dunnett's multiple comparison test. **** p < 0.0001 in comparison with 6 D/IV. (C) Cortical neurons in old brains had higher SA-β-gal activity (scale bars represent 500 μm) and accumulated lipofuscin. Scale bar represents 15 μm. (D) The percentage of SA-β-gal positive area within each brain section is plot. The average of three brains per age is graphed; 15 sections from each brain were quantified. Bars in graphs represent SEM. Unpaired t Test, ** p < 0.01. (E) Quantification of autofluorescence intensity per section (arbitrary units). Bars in graphs represent SD. The average of three brains per age is graphed; 15 sections from each brain were quantified. Even though there was an evident increase in autofluorescence, no statistical significance was obtained.

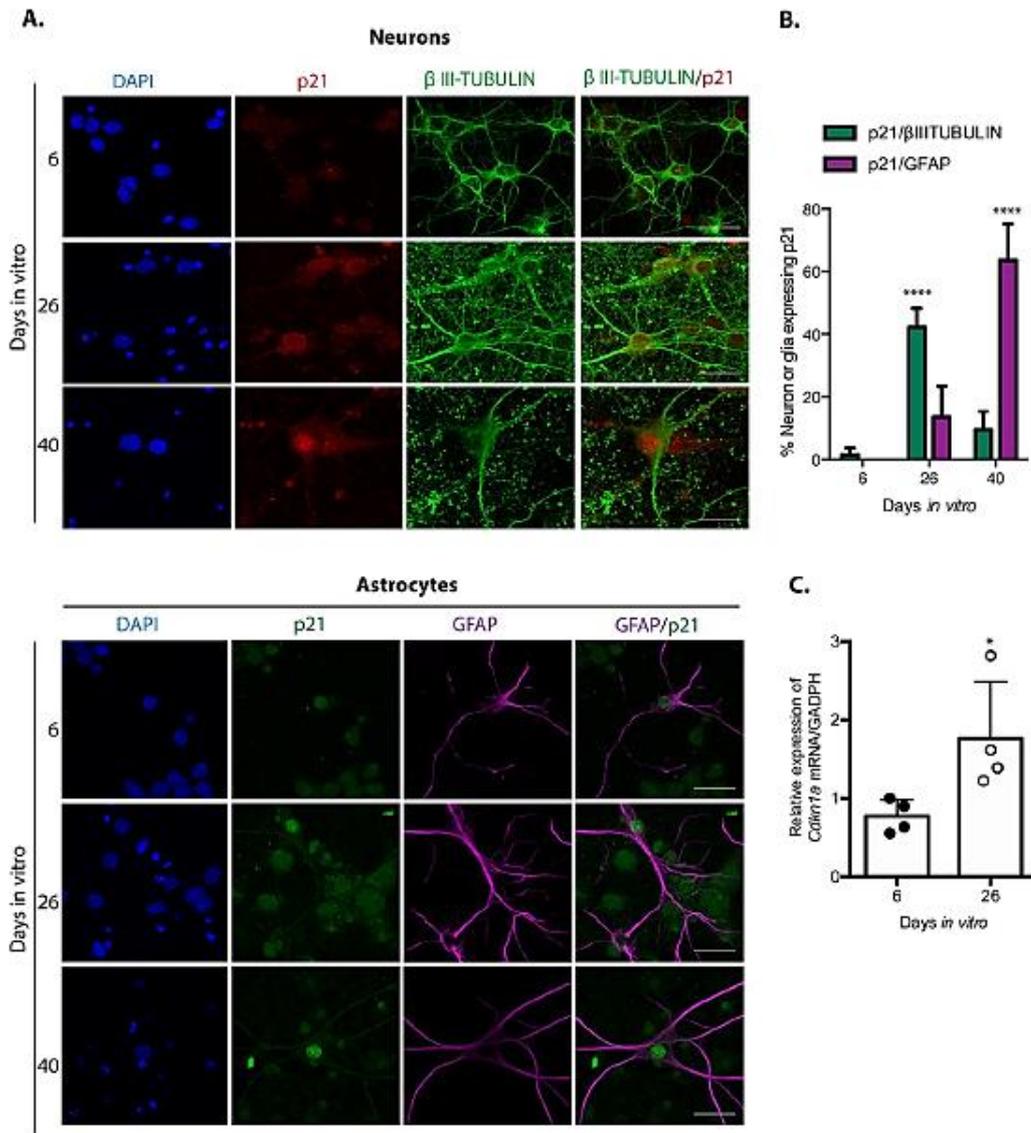
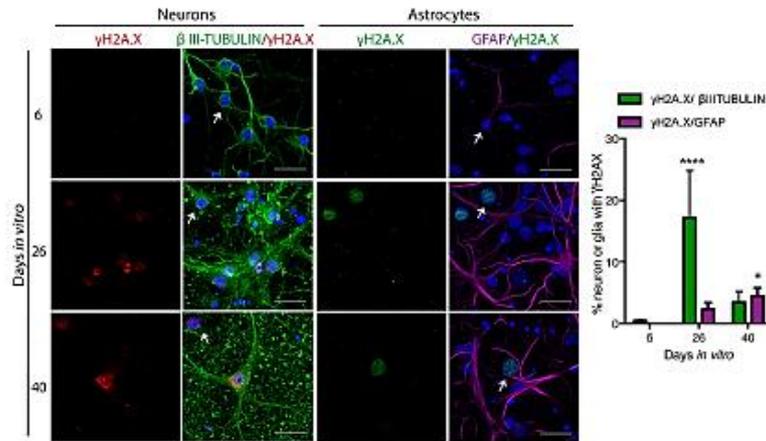
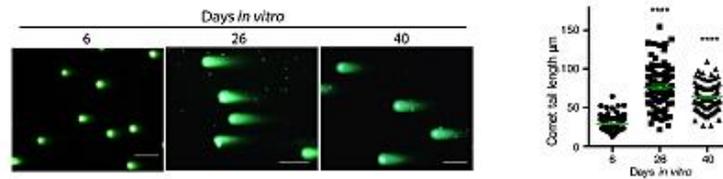


Figure 2. Neuronal cells in cortical long-term culture showed increased expression of p21^{CP1/WAF1}. (A) Immunofluorescence to detect p21^{CP1/WAF1} (p21) in neurons (expressing β III-TUBULIN) or astrocytes (expressing GFAP) in primary culture of cortical cells incubated during the indicated D/IV. Notice that mostly neurons increased the abundance of p21^{CP1/WAF1} at 26 D/IV, indicating that neurons acquired senescent features before glial cells. Scale bar represents 25 μ m. Arrows indicate examples of cells with healthy nuclei counted (not all the healthy cells are indicated). (B) Percentage of neurons or glial cells expressing p21^{CP1/WAF1} over all cells. The mean of three independent experiments, each done by duplicate, is plotted. Bars represent standard deviation. Two-way RM ANOVA analysis, with Tukey's multiple comparison test. **** $p < 0.0001$. (C) qRT-PCR from total RNA purified from cortical primary cultures during the indicated days. The relative expression of *Cdkn1a* mRNA was normalized with *Gapdh* mRNA. Bars represent SD. * $p = 0.039$ by unpaired t test two tailed. $n = 4$.

A. DDR in primary culture



B. DNA damage in primary culture



C. DDR in cortex

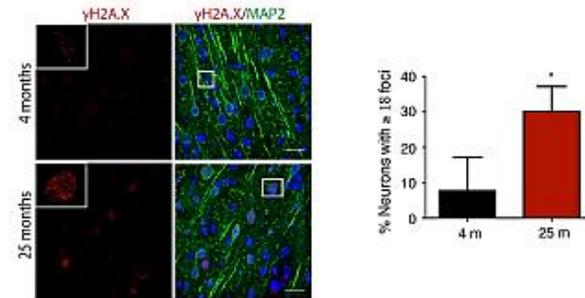


Figure 3. Neuronal cells in cortical long-term culture and in the cortex from old rat brains had a sustained DNA damage response (DDR). (A) Immunofluorescence to detect γ H2AX foci in neurons (expressing β III-TUBULIN) or astrocytes (expressing GFAP) in primary culture of cortical cells incubated during the indicated D/IV. Notice that mostly neurons have γ H2AX foci at 26 D/IV. Scale bar represents 25 μ m. Right, quantification of the percentage of neurons or glial cells with γ H2AX foci over all cells. The mean of three independent experiments, each done by duplicate, is plotted. Bars represent SEM. Two-way RM ANOVA analysis, with Dunnett's multiple comparison test. **** $p < 0.0001$ 26 D/IV vs. 6 D/IV; * $p < 0.05$ 40 D/IV vs. 6 D/IV. Arrows indicate examples of cells with healthy nuclei counted (not all the healthy cells are indicated). (B) Comet assay to detect double strand breaks in genomic DNA from cells collected at the indicated days. Scale bars represent 100 μ m. Right, the length of the tail of the comets, indicative of level of DNA damage, is plotted. 50 nuclei from each treatment, from two independent experiments, were analyzed by RM one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison. **** $p < 0.0001$ between 26 D/IV or 40 D/IV in comparison with 6 D/IV. (C) Immunofluorescence to detect γ H2AX foci in cortical neurons (expressing MAP2) in rat brains from the indicated age. Nuclei were stained with DAPI. Scale bars represent 30 μ m. Right, percentage of neurons with more than 18 foci per nucleus. More than 100 neurons were counted from 3 different brains of each age. Bars represent standard deviation. Unpaired t Test * $p < 0.01$.

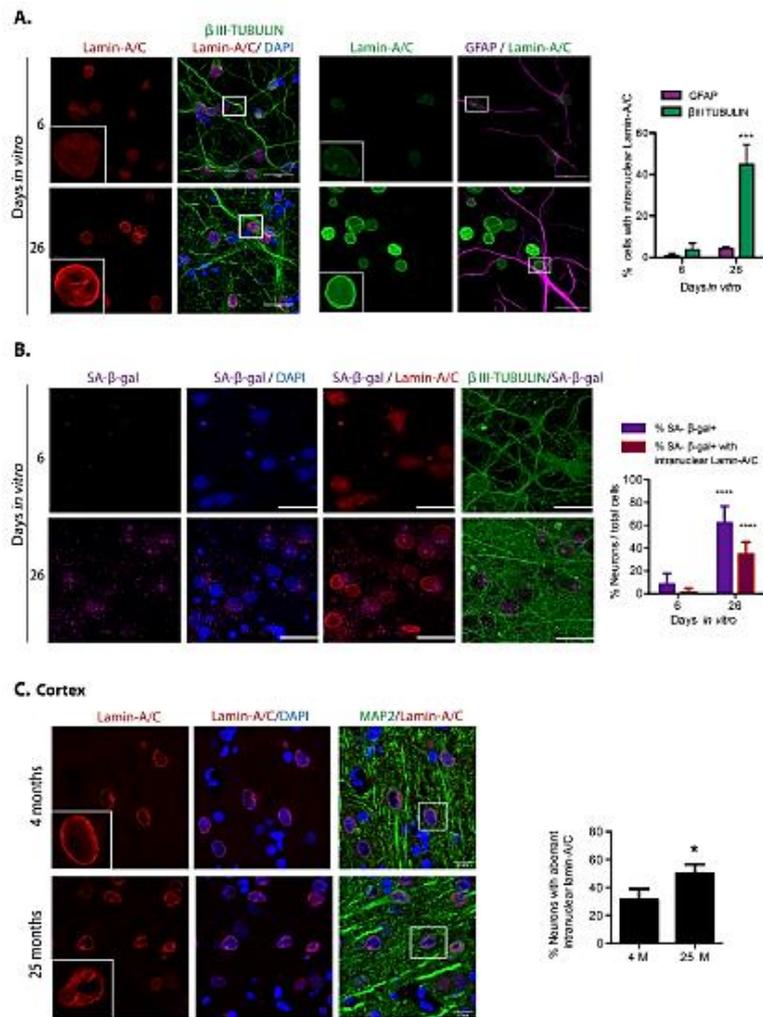


Figure 4. Cortical cells in long-term culture and in old rat brains had nuclear morphology abnormalities. (A) Immunofluorescence to detect Lamin-A/C in neurons (expressing βIII-TUBULIN) or astrocytes (expressing GFAP), in primary culture of cortical cells incubated during the indicated days *in vitro*. Squares indicate the magnified area shown in insets. Representative images of three independent experiments are shown. Scale bars represent 25 μm. Right, percentage of neurons or astrocytes with aberrant nuclear morphology over total cells. Bars represent SEM; two-way RM ANOVA analysis, *** $p < 0.001$ in comparison with 6 *DIV*. (B) Simultaneous detection of SA-β-gal activity (by confocal microscopy) and Lamin-A/C (by immunofluorescence) in neurons (expressing βIII-TUBULIN) in primary culture of cortical cells incubated during the indicated days *in vitro*. Representative images of three independent experiments are shown. Scale bars represent 25 μm. Right, percentage of neurons with visible SA-β-gal activity, and with both visible SA-β-gal activity and aberrant intranuclear Lamin-A/C over total cells. Five fields from three independent experiments were quantified. Bars represent SEM. Two-way RM ANOVA analysis, followed by Sidak's multiple comparison test. **** $p < 0.0001$ in comparison with 6 *DIV*. (C) Immunofluorescence to detect Lamin-A/C in cortical neurons in the internal pyramidal layer 5 from brain slices of the indicated age. Notice that also *in vivo*, neurons in old brains had nuclear deformations. Squares indicate the magnified area shown in insets. Scale bars represent 30 μm. Right, percentage of neurons in with aberrant nuclear morphology in cortical brain slices of the indicated age, as shown in (C). (n=3). Bars represent SD; unpaired t Test Student * $p < 0.01$.

notion that neurons become senescent before glial cells in this model. Since every senescent feature, alone, is not sufficient to confirm a senescent state, we simultaneously detected SA- β -gal activity and Lamin-A/C in neurons. As shown in Figure 4B, around half of the neurons with high SA- β -gal activity at 26 *DIV* also had an aberrant nuclear morphology, supporting the notion that neurons in long-term culture acquire senescent features. The

observation that some neurons with high SA- β -gal show a normal nuclear morphology, is in agreement with previous observation that SA- β -gal activity alone is not a reliable marker of senescence [21]. We propose that nuclear deformations could be a more reliable marker for neuronal senescence. Since differentiated neurons express low levels of Lamin-B1 [27], we were unable to detect loss of Lamin-B1 in senescent neurons.

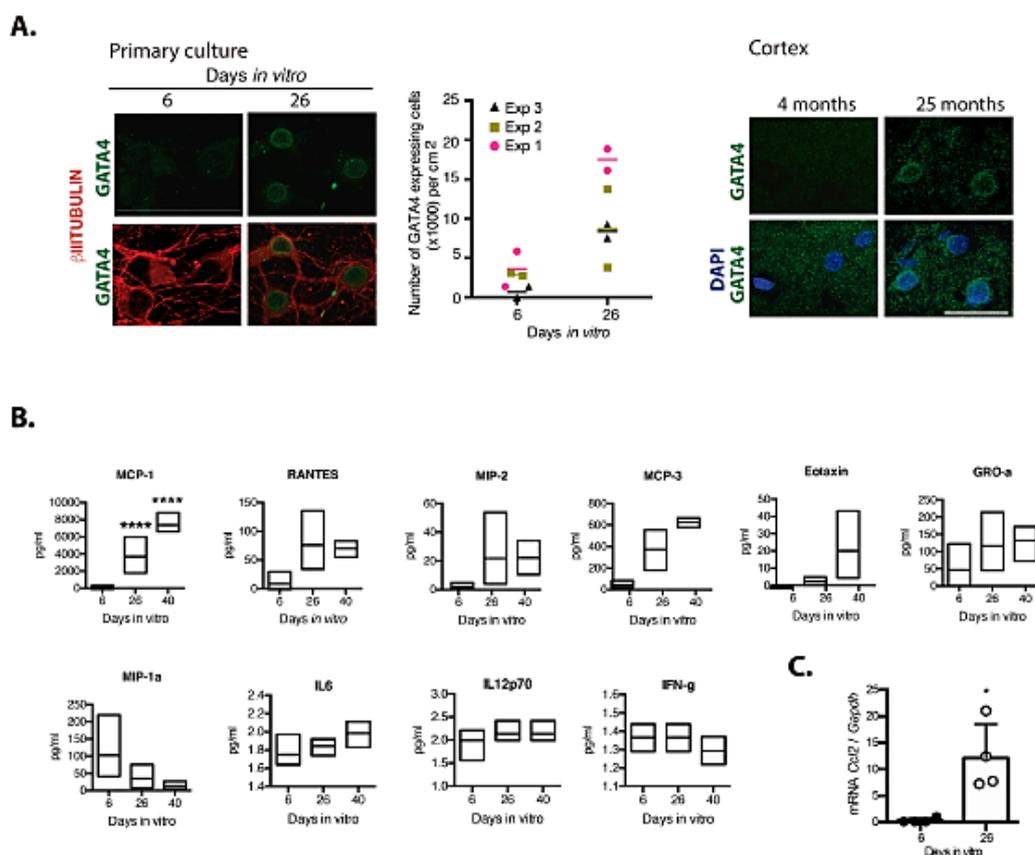


Figure 5. Senescent neurons increased the expression of GATA4 and cortical cells secreted MCP-1. (A) Immunofluorescence to detect GATA4 in neurons (expressing β III-TUBULIN) in primary culture of cortical cells either incubated during the indicated days *in vitro* or in rat brains of the indicated age. Scale bars represent 25 μ m. The number of cells with increased GATA4 abundance from three independent experiments, each performed in duplicate, is graphed. The mean of each experiment is represented by horizontal bars. (B) Quantification by multiplex immunoassay of the indicated cytokines, from conditioned media from cultures of the indicated days from three independent experiments. The maximum and minimum values are graphed. Bars indicate the mean of the three independent experiments. Data were analyzed by two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test analysis, only MCP-1 was significant. **** p<0.0001 relative to 6 *DIV*. (C) qRT-PCR from total RNA purified from cortical primary cultures during the indicated days. The relative expression of *Ccl2* mRNA was normalized with *Gapdh* mRNA. Bars represent SD. * p=0.0106 by unpaired t test two tailed. n=4.

Senescent cortical cells secrete molecules that induce premature paracrine senescence and glial proliferation, suggesting a neuronal SASP

We hypothesize that persistent senescent neurons, through the SASP, contribute to induce paracrine senescence and chronic inflammation in old brains. Therefore, we studied whether neurons would express GATA4, a transcription factor that promotes the expression of SASP factors [10]. As shown in Figure 5A, GATA4 accumulated in neuronal cells cultured for 26 *DIV*, as well in cortical neurons from old brains. To get an insight about the cytokines that senescent cortical cells could be secreting, we analyzed the presence of G-CSF, GM-CSF, IFN γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, TNF α , EOTAXIN, GRO- α , IP-10, MCP-1, MCP-3, MIP-1 α , MIP-2 and RANTES by a multiplex immunoassay. As shown in Figure 5B, MCP-1, RANTES, MIP-2, GRO-1, MCP-3 and EOTAXIN were more abundant in conditioned media from senescent cortical cultures, although only MCP-1 content showed a statistically significant difference at 26 and 40 *DIV* relative to 6 *DIV* cortical cultures; MIP-1 α secretion was reduced in older cultures. To our surprise, IL6, a common SASP component, was barely detected and did not increase in conditioned media from senescent cells. Also, IL-12p70 and IFN γ secretion did not change along the time in culture and were secreted in a very small amount, at the threshold limit of detection. G-CSF, GM-CSF, IL-1 α , IL-1 β , IL-10, IL-13, IL-17A, IL-2, IL-4, IL-5, TNF α , GRO- α , IP-10 and MIP-1 α were not detected at any time point. We further confirmed the induction of expression of *Ccl2* (gen coding for MCP-1) by qRT-PCR (Figure 5C).

Since MCP-1 has been shown to induce paracrine senescence [23], and GATA 4 is a mediator regulating MCP-1 expression during senescence induced by Lamin-A defects [28], we reasoned that senescent cortical cells could indeed acquire a functional SASP. To test this hypothesis, we analyzed whether conditioned media from senescent cortical cells could induce premature paracrine senescence (a schematic experimental design is shown in Figure 6A). To obtain conditioned media with accumulated secreted factors, the media was left for intervals of about a week in between fresh media changes over the cells, and it was collected at 6, 26 or 40 days of culture. Conditioned media was then added to young (1 *DIV*) prenatal cortical cells and after 6 *DIV* of treatment all the senescent markers described above were evaluated. Interestingly, conditioned media from cortical cells cultured for 26 *DIV* or 40 *DIV* induced abundant proliferation of glial cells (Figure 6B), suggesting that senescent cortical cells, potentially neurons, could

indeed affect tissue organization. Nevertheless, we did not observe significant expression of senescent markers on young neurons (not shown). We reasoned that young neurons could be more resistant to paracrine senescence than mitotic cells; therefore, we tested whether the conditioned media from cortical cells cultured for 26 *DIV*, time at which most of the senescent cells are neurons, would induce paracrine senescence in mouse embryonic fibroblast (MEFs). Indeed, conditioned media from cortical cells cultured for 26 *DIV* induced key senescent features in MEFs, such as increased SA- β -gal activity; inhibition of proliferation (detected by Ki67 expression); DNA damage response identified by γ H2AX foci; and increased expression of IL6, although this latter was not statistical different (Figure 6C). In summary, prenatal cortical cells exposed for 6 days to conditioned media from cortical cells cultured for 26 *DIV* or 40 *DIV* did not show senescent features, whereas MEFs did.

Taken together, our results confirm that neurons acquire senescent features potentially including the SASP, interestingly before glial cells. This observation suggests that senescent neurons could affect the function of surrounding cells, such as astrocytes. Intriguingly, young neurons were unresponsive to the SASP produced by senescent cortical cells, since they did not show senescent markers when exposed to the conditioned media from cortical cultures of 26 or 40 *DIV* (not shown).

Dysfunctional autophagy contributes to neuronal senescence

Abundant reports indicate that dysfunctional autophagy accompanies aging, and in the brain it causes neurodegeneration [29]. Accordingly, induction of autophagy ameliorates age-related cognition deficits [30]. Therefore, we evaluated whether dysfunctional autophagy would contribute to neuronal senescence establishment, with a similar mechanism as described for senescence transition of mitotic cells. First, we analyzed in senescent neurons whether autophagic flux is reduced, reflected by accumulation of autophagosomes and proteins associated to them like LC3 and p62/SQSTM1. As shown in Figure 7A, cortical cells at 26 *DIV*, a time point when neurons showed senescent features, had more autophagosomes detected with the specific dye CytoID $\text{\textcircled{R}}$ and by immunofluorescent detection of LC3. We confirmed the abundance of autophagosomes in senescent neurons by electron microscopy, labeling them with immunogold localization of LC3. As the autophagic receptor p62/SQSTM1 is degraded together with the cargo, it accumulates when the autophagic flux is interrupted. We analyzed the abundance of p62/SQSTM1 by

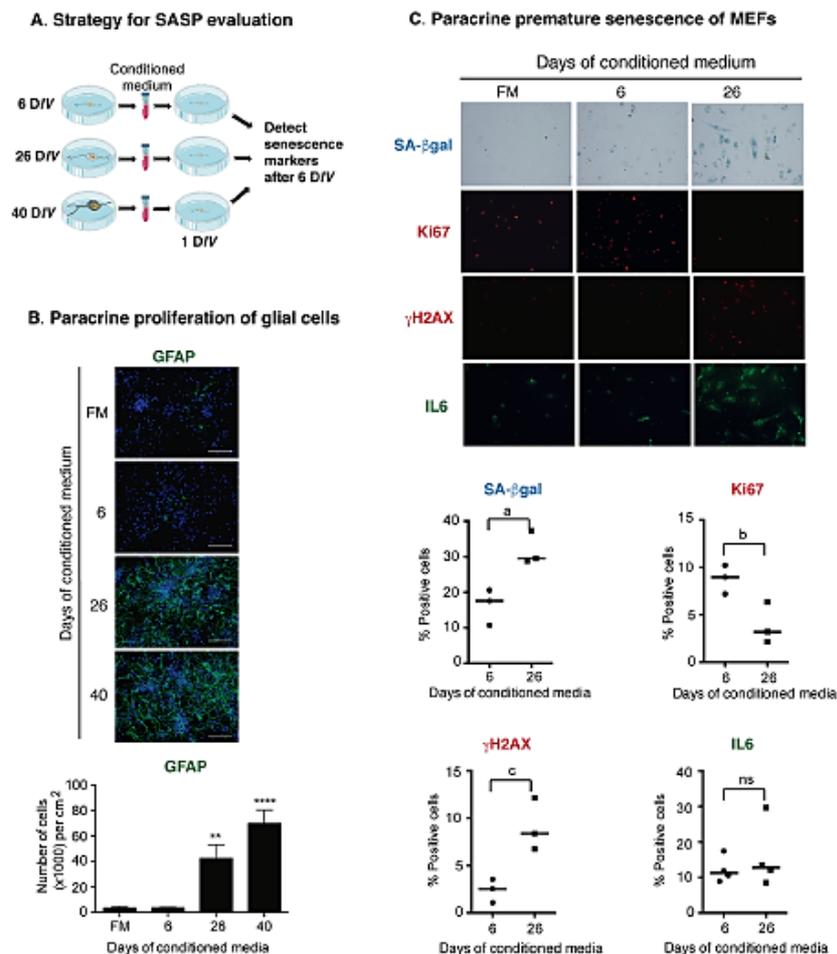


Figure 6. Senescent cortical cells develop a functional SASP. (A) Experimental design to evaluate the presence of secreted molecules with SASP activity from senescent cortical cells. Conditioned media was collected from cortical cells that had been incubated from 1-6 (6), 19-26 (26) or 32-40 (40) D/V. Either primary prenatal cortical cells or MEFs were cultured for 24 hr (1 D/V) before adding conditioned media; senescence markers were evaluated 6 days later. (B) Conditioned media from senescent cortical cells induced paracrine proliferation of glial cells in primary culture of prenatal cortical cells. Representative immunofluorescences to detect GFAP in cortical cells are shown. Cells were incubated with conditioned media collected from cortical cells that had been incubated during the indicated D/V. FM stands for fresh medium. Notice that conditioned media from 26 D/V and 40 D/V induced high proliferation of glial cells. Scale bars represent 500 μ m. The bottom graph is a quantification of the number of GFAP expressing cells in three independent experiments, each done in duplicate. Data were analyzed by one-way ANOVA, with Dunnett's multiple comparison test. ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$ compared to FM. (C) Conditioned media from senescent cortical cells induced paracrine premature senescence in MEFs. MEFs were incubated with conditioned media collected from cortical cells that had been incubated during the indicated D/V. FM stands for fresh medium. Notice that senescent markers were higher in cells incubated with conditioned media from cortical cells cultured for 26 days. The bottom graphs are quantifications of the percentage of cells with blue or fluorescent signals. The signal (either blue or fluorescent) from cells incubated with 6 D/V conditioned media plus one standard deviation was deducted from the signal obtained from the cells treated with 26 D/V conditioned media. Three independent experiments, each performed in duplicate were quantified. Data were analyzed by unpaired T test. a, $p = 0.0175$; b, $p = 0.0327$; c, $p = 0.0191$.

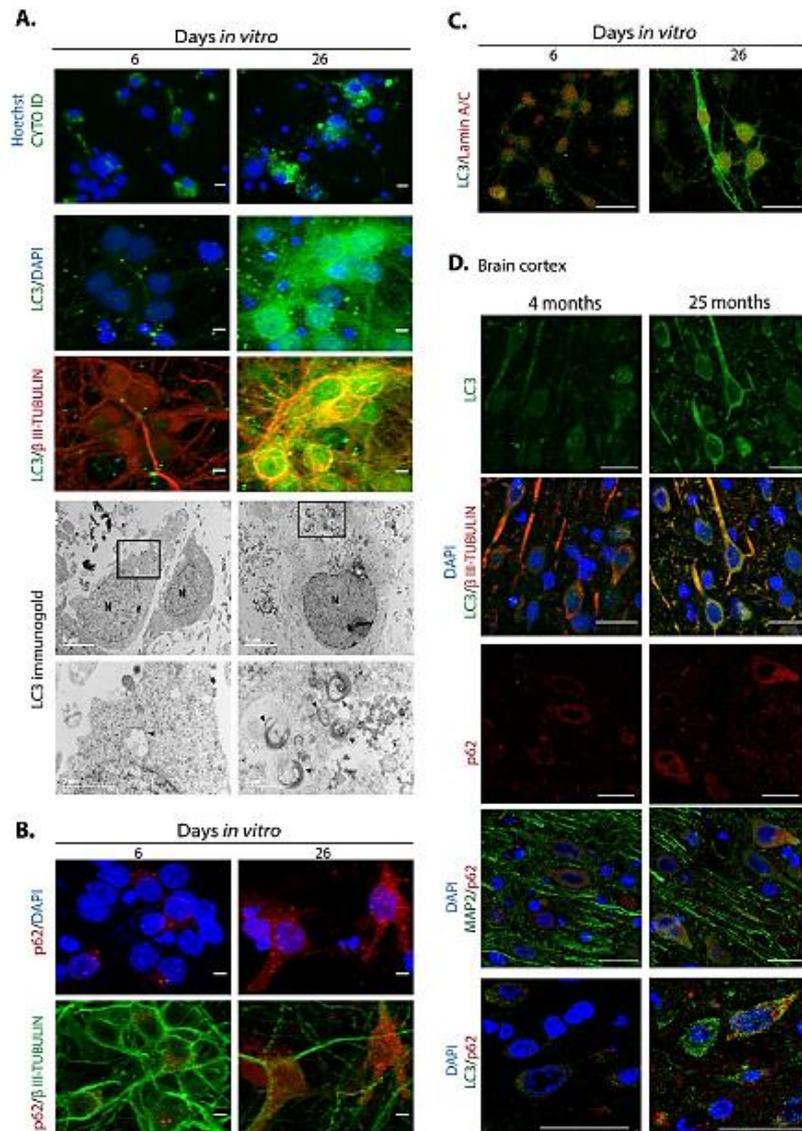


Figure 7. Autophagosomes accumulate during neuronal senescence. (A) Top row, autophagosomes were stained with CytoID[®] and nuclei with Hoechst in primary culture of cortical cells incubated during the indicated D/V; scale bars represent 15 μ m. Middle rows, immunofluorescence to detect LC3 in neurons (expressing β III-TUBULIN) of primary cortical cells cultivated during the indicated D/V. Scale bars represent 5 μ m. Bottom rows, electron micrographs showing accumulation of autophagosomes in 26 D/V cortical cells, detected by immunogold localization of LC3 (arrow heads). Squares indicate the amplified area below. (B) Immunofluorescence to detect p62/SQSTM1 in cortical cells cultured during the indicated D/V. Nuclei were stained with DAPI. Notice that p62/SQSTM1 in neurons (expressing β III-TUBULIN) accumulated at 26 D/V. Scale bars represent 5 μ m. (C) Immunofluorescence to simultaneously detect LC3 and Lamin-A/C to observe intranuclear folds as a senescence marker, in cortical cells cultured during the indicated D/V. Scale bars represent 25 μ m. (D) LC3 and p62/SQSTM1 also accumulate in cortical neurons (expressing β III-TUBULIN or MAP2) from old rat brains. Scale bars represent 30 μ m.

immunofluorescence (Figure 7B) and Western blot (Figure 8B), and we found that it was also accumulated in neurons at 26 DIV. To determine whether indeed senescent cells had more autophagosomes, we simultaneously detected LC3 and Lamin-A/C. As shown in Figure 7C, the same cells that had intranuclear folds of the nuclear envelop with Lamin-A/C at 26 DIV had LC3 accumulation (Figure 7C). Importantly, both LC3 and p62/SQSTM1 also accumulated in cortical neurons of old rat brains (Figure 7D). The accumulation of both autophagosomes and p62/SQSTM1 suggests dysfunctional lysosomes or impairment of the fusion of autophagosomes with lysosomes. We stained lysosomes with LysoTracker® and observed an accumulation of

enlarged lysosomes in senescent cortical cells (Figure 8A), as it has been described in another model of neuronal senescence [21]. We confirmed altered lysosomal morphology by localizing the lysosomal protein LAMP1; we noticed that abundant p62/SQSTM1 puncta did not co-localize with LAMP1 at 26 DIV (Figure 8A), suggesting limited autolysosome maturation (*i.e.* reduced autophagosome-lysosome fusion), although further studies are needed to corroborate it.

p62/SQSTM1 accumulates when autophagy promotes the SASP through a compartmentalized structure coined TASCC (Tor-autophagy spatial coupling compartment),

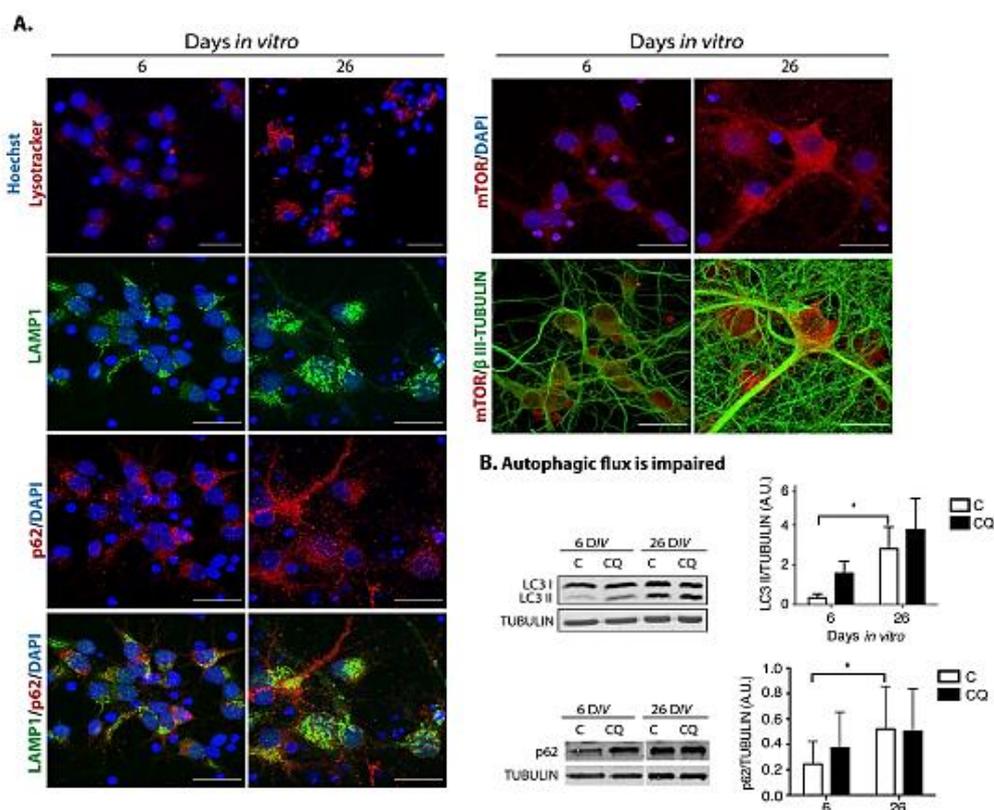


Figure 8. Dysfunctional autophagy contributes to neuronal senescence. (A) There was an accumulation of enlarged lysosomes and undigested p62/SQSTM1 in senescent neurons. Top row, lysosomes were detected with LysoTracker® and nuclei with Hoechst in primary culture of cortical cells incubated during the indicated DIV. Bottom rows, immunofluorescence to detect the indicated proteins in cortical cells cultured during 6 or 26 days. Nuclei were stained with DAPI. Notice that even though lysosomes and p62/SQSTM1 accumulated at 26 DIV, their intracellular distribution did not overlap. mTOR distribution did not change. Scale bars represent 25 μ m. (B) The autophagic flux was impaired in senescent neurons. Western blot of total protein extracts from cortical cells cultured at 6 or 26 days, without (C) or with (CQ) 20 μ M Chloroquine for 4 hr. Graphs represent the mean of densitometry analysis of four independent experiments. Bars represent SEM. Two-way RM ANOVA followed by Sidak's multiple comparison test. * $p < 0.001$.

which is where amino acids released by autolysosomes locally activate mTORC1, facilitating the synthesis of SASP proteins. The TASC can be distinguished by the polarized co-localization of p62/SQSTM1, mTOR and LAMP2 [11]. Therefore, we analyzed whether during neuronal senescence these proteins were also distributed in a similar polarized intracellular localization (we observed LAMP1 instead of LAMP2). As can be seen in Figure 8A, neither the distribution of p62/SQSTM1 nor mTOR indicated a compartmentalized distribution. Even though lysosomes seemed to be mainly located on one side of the cells, it might reflect only the particular morphology of this type of cells, which have the cytoplasm mostly on one side of the cell. Therefore, we found no evidence of a TASC during neuronal senescence, indicating that autophagy dysfunction, rather than function, accompanies neuronal senescence. To verify that the observed accumulation of autophagosomes was due to an impaired autophagic flux, instead of an enhanced activation of autophagy, cortical cells were incubated in the presence of Chloroquine, an agent that neutralizes lysosomes pH and impairs autophagosomes fusion with lysosomes. As shown in Figure 8B, the presence of Chloroquine did not increase the amount of LC3-II or p62/SQSTM1 accumulation at 26 *DIV*, indicating that the autophagic flux was already diminished in senescent neurons.

If a limited autophagic flux contributes to neuronal senescence, we would expect more senescent cells when autophagy is inhibited. Since basal autophagy is essential for survival, inhibition of autophagy by genetic means along the time of culture kills the neurons. Therefore, we inhibited autophagy only at distinct time windows (7 days long each) by adding Spautin-1, a molecule that indirectly induces BECN1 and PtdIns-3-kinase type 3/VPS34 (PI3KC3) degradation [31]. As shown in Figure 9B, we found that the number of cells with SA- β -gal activity increased when autophagy was inhibited during the second or third weeks of culture. When Spautin-1 was added at the fourth week of culture or later, it had no effect increasing the number of cells with SA- β -gal activity, suggesting that autophagy was already dysfunctional at this time. On the other hand, stimulating autophagy with trehalose, a disaccharide that mimics caloric restriction by preventing glucose uptake [32], reduced the number of cortical cells with SA- β -gal activity regardless of the time window of exposure, although a more noticeable protection was observed during the second and third weeks of culture. As a control to verify the function of Spautin-1 in neurons, we verified the reduction in the number of autophagosomes in cortical cells at 26 *DIV*, when we had previously observed abundant autophagosomes. We also tested that trehalose stimulates autophagy in neurons by detecting more autophagosomes in cortical

cells at 6 *DIV*, which time we had observed neurons have a reduced amount of autophagosomes (Supplementary Figure 2S). To confirm that trehalose induction of autophagy indeed reduced the senescent phenotype and not just SA- β -gal activity, we repeated the experiment now immunodetecting Lamin-A/C to evaluate whether the intranuclear folds were reduced. As shown in Figure 9C, adding trehalose during one week windows statistically significantly reduced the degree of intranuclear Lamin-A/C folds. These results suggest that autophagy induction prevents senescence conversion and potentially reverts the senescent phenotype, although further experiments will be needed to address the latter.

DISCUSSION

Accumulating evidence shows the presence of senescent cells in brains from both physiologically aged subjects and with neurodegeneration [14]. In this work we have characterized an *in vitro* model useful to study the molecular basis for neuronal senescence transition and maintenance, as well as SASP components. We demonstrate that neurons, in spite of being post-mitotic cells, acquire multiple senescent features and notably they do so before glial cells. Every senescent marker we looked at in primary culture of senescent neurons was confirmed in old rat brains (25 months old), validating this *in vitro* neuronal senescence model. We demonstrated, to our knowledge for the first time, that senescent cortical cells develop a functional SASP, secreting components able to induced paracrine senescence in MEFs and glial proliferation. Since most of the senescent cells at 26 *DIV* are neurons, we suggest the existence of a neuronal SASP, although it is still possible that the few senescent astrocytes present in the culture secrete a very potent SASP. Nevertheless, a neuronal SASP is supported by other observations, such as the induction of expression of pro-inflammatory cytokines like TNF- α and CCL2 [33]. Interestingly, dopaminergic neurons with senescent phenotype due to lack of expression of SATB1, a DNA binding protein reduced in the vulnerable region of Parkinson's Disease patients, express several SASP components, including MCP-1 [34], the cytokine we found significantly secreted by senescent cortical cells. MCP-1 is also secreted by senescent human mesenchymal stem cells and induces paracrine senescence; according to our findings, MCP-1 expression is mediated by GATA4 [28], a transcription factor we found increased in senescent cortical neurons. Further experiments are necessary to demonstrate that indeed MCP-1 secreted by senescent cortical neurons is the molecule responsible for the induction of paracrine senescence in MEFs. To our surprise, we did not detect secretions of IL6, as it is a very common SASP component and has

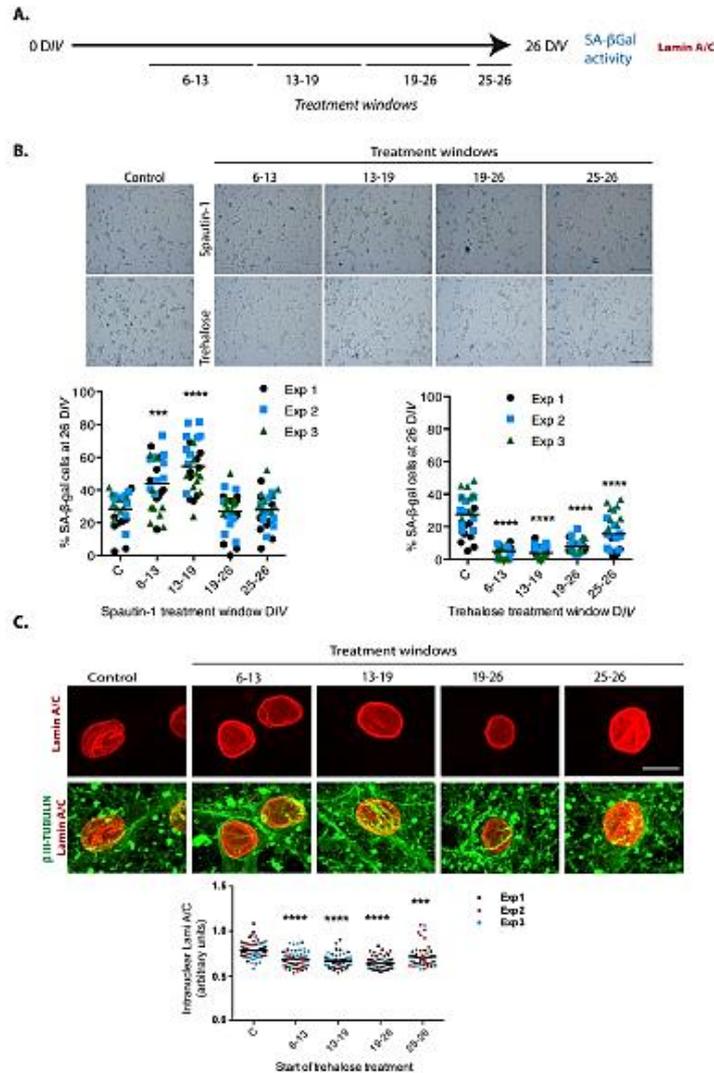


Figure 9. Autophagy modulation alters cortical cells senescence. (A) Experimental design. (B) Early inhibition of autophagy with Spautin1 increased the number of cells with SA-β-gal activity, while early induction of autophagy by adding trehalose reduced them. Spautin1 or trehalose were added during periods of several days, at the indicated time intervals in days of culture (DIV); after 26 DIV all cultures (including control with no treatment) were fixed to quantify the percentage of cells showing high SA-β-gal activity. Scale bars represent 500 μm. The bars in graphs represent the mean of each independent experiment, each done by triplicates. Three fields from each replica were scored (9 fields per experiment), each dot represent the percentage of SA-β-gal positive cells per field. Data were analyzed by two-way RM ANOVA, followed by Dunnett's multiple comparison test. *** $p < 0.001$ Spautin1 added during 6-13 DIV in comparison with control; **** $p < 0.0001$ Spautin1 added during 13-19 DIV in comparison with control, and Trehalose treatments in comparison with control. (C) Autophagy induction with trehalose reduced the abundance of intranuclear fold with Lamin-A/C. Trehalose were added during periods of several days, at the indicated time intervals in days of culture (DIV); after 26 DIV all cultures (including control with no treatment) were fixed to detect Lamin-A/C by immunofluorescence. Scale bar represents 5 μm. Representative images of three independent experiments are shown. At least 60 cells per treatment were quantified as described in Methods. Bars in the bottom graph represents mean. Data were analyzed by two-way RM ANOVA, followed by Dunnett's multiple comparison test. *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ with respect to control.

been found to be secreted in senescent neurons by others [22]. It is worth to note that the paracrine senescence signaling components seem to be conserved between rat and mouse, as the rat neuronal SASP was able to induce premature paracrine senescence in mouse fibroblasts (MEFs).

The finding that conditioned media from senescent cortical cells induced glial cell proliferation, suggests that persistent neuronal senescent cells could alter tissue organization. As opposed to replicative senescence, which is caused by critically short telomeres, premature senescence induced by oncogene activation initiates with hyper-proliferation, followed by a “transition phase” that signals to induce the senescent phenotype [35]. Further experiments are in progress to evaluate whether the increased proliferation of astrocytes we observed reflects a mitotic phase preceding senescence in response to the cortical SASP. Also, the finding that young neurons are resistant to undergo premature paracrine senescence in response to the SASP produced by senescent cortical cells deserves further investigation. It will be interesting to understand the molecular differences that render MEFs susceptible and prenatal cortical neurons resistant to paracrine senescence in response to the cortical SASP. Although we ought to mention that we observed in one out of six experiments an increase of young neurons with high SA- β -gal activity in response to conditioned media from senescent neurons, therefore, it is yet possible that senescent cortical cell secretes molecules able to induce neuronal paracrine senescence, but which are rather labile. We propose that persistent senescent cells in the brain would secrete molecules that induce chronic inflammation and propagate further paracrine senescence to nearby healthy cells within the brain, like astrocytes, microglia or endothelial cells, thereby spreading the senescent phenotype and thus contributing to brain aging and exacerbating neurodegeneration. In fact, chronic and low-grade inflammation (inflammation) have been associated with neurodegeneration in aging [36, 37] and cellular senescence markers have been observed in brain tissues from Alzheimer’s disease patients, such as p16^{INK4A} expression, increased p38MAPK activity, and IL6 and TGF β mRNA expression [38-41]. Actually, brain overexpression of IL6 in mice induces neurodegeneration [42]. Promising, two recent works demonstrate that eliminating senescent cells in the brain ameliorate Tau-dependent neuropathology in mice transgenic models. Bussian TJ, *et al.* did not find neurons with senescent features (looking for SA- β -gal activity and the mRNA expression of *p16*, *p19*, *p21*, *pail* and *Il6* in an enriched population of cells expressing Cd56), and propose that senescent microglia and astrocytes induce Tau-containing neurofibrillary tangles (NFT) in neurons by

an unknown mechanism [43]. Interestingly, Musi N *et al.* analyzed laser-captured microdissected cortical neurons from human brains with Alzheimer disease and compared their transcriptome signature with adjacent histopathologically normal neurons. NFT-containing neurons had a senescent gene expression profile. The same was observed in NFT-containing neurons in a Tau transgenic mouse line [44]. Therefore, it seems that all cell types in the brain are able to become senescent, but the timing of geroconversion could vary in different contexts. Since in both works senolytics ameliorated Tau-dependent neuropathology, to discover which cell type becomes senescent and how similar are senescent cells from different cell types, will be useful to design targeted therapies.

Considering that it has been widely documented that during aging autophagy becomes dysfunctional [45], that most of the interventions that improve health span and/or lifespan stimulate autophagy [46, 47], and our finding that Spautin-1 treatment increased the number of senescent cortical cells, we propose that dysfunctional autophagy during aging also contributes to cellular senescence in the brain, including neurons, which in turn contributes to synaptic dysfunction. It is fundamental, therefore, to understand the mechanisms of autophagy dysfunction with ageing in the brain. Perhaps the tubular morphology of lysosomes we observed in senescent cortical neurons interferes with lysosomes fusion with autophagosomes. Therefore, treatments that promote autolysosome maturation or prevent lysosomal dysfunction could solve or prevent the onset of neuronal senescence. Interestingly, our observation that trehalose reduced the number of senescent cortical cells suggests that the neuronal senescent phenotype is reversible. Supporting this notion, addition of resveratrol, an autophagy-inducer compound, also decreases senescent hallmarks of long-term neuroglial cocultures [22]. Further experiments are necessary to test the possible reversion of the neuronal senescent phenotype.

Having a molecular understanding of neuronal senescence, new targets for pharmacological intervention could be proposed, with potential impact to prevent or reduce both physiological brain aging and neurodegeneration.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Wistar rats of the indicated age in each experiment were obtained from the animal house of the Institute of Cell Physiology at the National University of Mexico (UNAM) and were housed at 22 °C in 12h light/12h

dark cycle. All procedures were approved by the Internal Committee of Care and Use of Laboratory Animals of the Institute (IFC-SCO51-18). Rats had *ad libitum* access to water and food.

Cell Culture

Cortical primary cultures

Cortical primary cultures were prepared as described before [48], from Wistar rat embryos of 17 days of gestation. Cerebral cortices were isolated and dissociated by 1:1400 Trypsin-EDTA (15400054, INVITROGEN/GIBCO, Grand Island, NY, USA) digestion and trituration with a Pasteur pipette. Cells were suspended in Neurobasal medium (21103049, INVITROGEN/GIBCO, Grand Island, NY, USA) supplemented with 2% B27 (17504044, INVITROGEN/GIBCO, Grand Island, NY, USA), 200 mM GlutaMAX™ Supplement (35050061, GIBCO Life Technologies, Grand Island, NY, USA) and 0.02 mg/ml Gentamicin (15710064, INVITROGEN/GIBCO, Grand Island, NY, USA). Cells were plated at a density of $1.05 \times 10^3/\text{cm}^2$ in 12-well plates precoated with Poly-L-Lysine (P1524, SIGMA-ALDRICH St. Louis, MO, USA) (0.01 mg/ml). Cells were cultured up to 40 days *in vitro* (40 DIV) at 37°C in a humidified, 5% CO₂ atmosphere. Half the medium was changed every 6 days.

Cell viability

Cell viability was estimated by staining with LIVE/DEAD viability/cytotoxicity kit (INVITROGEN/GIBCO, Grand Island, NY, USA). Alive cells were stained with Calcein, while dead cells were stained with Ethidium homodimer-1, following manufacturer's instructions. For every experiment, only cells with healthy nuclear morphology (non apoptotic) were quantified.

MEFs culture

Mouse embryonic fibroblasts were isolated from CD1 mouse embryos at E13.5 following the standard protocol [49]. MEFs were seeded at a density of 2.6×10^3 cells/cm² with Dulbecco's Modified Eagle Medium + GlutaMAX™, 10% FBS and Penicillin/Streptomycin 100 U/ml. Each experiment was performed with MEFs at cell passage 4 to avoid replicative senescence. For conditioned media experiments, one day after seeding, cells were cultured with 25% OptiMEM supplemented with GlutaMAX and 75% of conditioned media. Media and supplements were from GIBCO® Life Technologies™, Grand Island, NY, USA.

SA-β-galactosidase staining

The β-galactosidase activity was analyzed following the protocols described previously [50, 51]. Cells were

fixed with 2% formaldehyde + 0.2% glutaraldehyde for 5 min, washed with PBS and stained with the staining solution containing: 20 mg/ml of X-gal (IB02260, IBI SCIENTIFIC, Peosta, IA, USA) in dimethylformamide, 0.2 M citric acid/sodium phosphate buffer pH=6, 100 mM potassium ferrocyanide, 5 M sodium chloride and 1 M magnesium chloride. Cells were incubated for 16 h at 37 °C. For colorimetric analysis, samples were observed in an inverted Nikon ECLIPSE Ti-U microscope, the number of positive cells was counted of at least 500 cells. For SA-β-galactosidase staining and immunofluorescence in the same samples, cells were stained for SA-β-gal as described above and then immunostained. Confocal detection of X-gal was performed as previously described [52].

Lipofuscin accumulation

Autofluorescence Detection

Lipofuscin auto-fluorescence was evidenced by excitation at 450-490 nm of unstained cortical cells using an inverted Nikon ECLIPSE Ti-U microscope.

Sudan Black B (SBB) staining

SBB staining was performed as described [24]. 0.7 g of SBB (199664, SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA) were dissolved in 70% ethanol, covered with Parafilm® and thoroughly stirred overnight at room temperature. Afterwards the solution was filtered (paper filter Whatman™ 1001-110). Cells seeded on coverslips were fixed in 4% (wt/vol) formaldehyde/PBS for 30 min at room temperature and then washed three times at room temperature with PBS. Coverslips with fixed cells were incubated for 2 min in 70% ethanol. A drop of freshly prepared SBB was dropped on a clean slide. The coverslip with the cells was held facing down on the drop of SBB on the slide and was incubated for 10 seconds. The coverslip was carefully lifted and the SBB on the edges of the coverslip was wiped off manually from the back and along the edges of the coverslip with the help of an absorbent paper. The cells were then embedded into 50% ethanol for 1 min, transferred and washed with distilled water. The staining was observed under an inverted Nikon ECLIPSE Ti-U microscope and SBB staining was considered positive when cytoplasmic aggregates of blue-black granules were evident inside the cells. Three independent experiments, each done by quintupled replicas, were analyzed.

Immunofluorescence

Primary culture

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min, permeabilized with PBS / 0.5% Triton for 5 min, blocked with PBS/5% BSA and incubated at 4 °C with primary antibody overnight. AlexaFluor-conjugated

dark cycle. All procedures were approved by the Internal Committee of Care and Use of Laboratory Animals of the Institute (IFC-SCO51-18). Rats had *ad libitum* access to water and food.

Cell Culture

Cortical primary cultures

Cortical primary cultures were prepared as described before [48], from Wistar rat embryos of 17 days of gestation. Cerebral cortices were isolated and dissociated by 1:1400 Trypsin-EDTA (15400054, INVITROGEN/GIBCO, Grand Island, NY, USA) digestion and trituration with a Pasteur pipette. Cells were suspended in Neurobasal medium (21103049, INVITROGEN/GIBCO, Grand Island, NY, USA) supplemented with 2% B27 (17504044, INVITROGEN/GIBCO, Grand Island, NY, USA), 200 mM GlutaMAX™ Supplement (35050061, GIBCO Life Technologies, Grand Island, NY, USA) and 0.02 mg/ml Gentamicin (15710064, INVITROGEN/GIBCO, Grand Island, NY, USA). Cells were plated at a density of $1.05 \times 10^3/\text{cm}^2$ in 12-well plates precoated with Poly-L-Lysine (P1524, SIGMA-ALDRICH St. Louis, MO, USA) (0.01 mg/ml). Cells were cultured up to 40 days *in vitro* (40 DIV) at 37°C in a humidified, 5% CO₂ atmosphere. Half the medium was changed every 6 days.

Cell viability

Cell viability was estimated by staining with LIVE/DEAD viability/cytotoxicity kit (INVITROGEN/GIBCO, Grand Island, NY, USA). Alive cells were stained with Calcein, while dead cells were stained with Ethidium homodimer-1, following manufacturer's instructions. For every experiment, only cells with healthy nuclear morphology (non apoptotic) were quantified.

MEFs culture

Mouse embryonic fibroblasts were isolated from CD1 mouse embryos at E13.5 following the standard protocol [49]. MEFs were seeded at a density of 2.6×10^3 cells/cm² with Dulbecco's Modified Eagle Medium + GlutaMAX™, 10% FBS and Penicillin/Streptomycin 100 U/ml. Each experiment was performed with MEFs at cell passage 4 to avoid replicative senescence. For conditioned media experiments, one day after seeding, cells were cultured with 25% OptiMEM supplemented with GlutaMAX and 75% of conditioned media. Media and supplements were from GIBCO® Life Technologies™, Grand Island, NY, USA.

SA-β-galactosidase staining

The β-galactosidase activity was analyzed following the protocols described previously [50, 51]. Cells were

fixed with 2% formaldehyde + 0.2% glutaraldehyde for 5 min, washed with PBS and stained with the staining solution containing: 20 mg/ml of X-gal (IB02260, IBI SCIENTIFIC, Peosta, IA, USA) in dimethylformamide, 0.2 M citric acid/sodium phosphate buffer pH=6, 100 mM potassium ferrocyanide, 5 M sodium chloride and 1 M magnesium chloride. Cells were incubated for 16 h at 37 °C. For colorimetric analysis, samples were observed in an inverted Nikon ECLIPSE Ti-U microscope, the number of positive cells was counted of at least 500 cells. For SA-β-galactosidase staining and immunofluorescence in the same samples, cells were stained for SA-β-gal as described above and then immunostained. Confocal detection of X-gal was performed as previously described [52].

Lipofuscin accumulation

Autofluorescence Detection

Lipofuscin auto-fluorescence was evidenced by excitation at 450-490 nm of unstained cortical cells using an inverted Nikon ECLIPSE Ti-U microscope.

Sudan Black B (SBB) staining

SBB staining was performed as described [24]. 0.7 g of SBB (199664, SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA) were dissolved in 70% ethanol, covered with Parafilm® and thoroughly stirred overnight at room temperature. Afterwards the solution was filtered (paper filter Whatman™ 1001-110). Cells seeded on coverslips were fixed in 4% (wt/vol) formaldehyde/PBS for 30 min at room temperature and then washed three times at room temperature with PBS. Coverslips with fixed cells were incubated for 2 min in 70% ethanol. A drop of freshly prepared SBB was dropped on a clean slide. The coverslip with the cells was held facing down on the drop of SBB on the slide and was incubated for 10 seconds. The coverslip was carefully lifted and the SBB on the edges of the coverslip was wiped off manually from the back and along the edges of the coverslip with the help of an absorbent paper. The cells were then embedded into 50% ethanol for 1 min, transferred and washed with distilled water. The staining was observed under an inverted Nikon ECLIPSE Ti-U microscope and SBB staining was considered positive when cytoplasmic aggregates of blue-black granules were evident inside the cells. Three independent experiments, each done by quintupled replicas, were analyzed.

Immunofluorescence

Primary culture

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min, permeabilized with PBS / 0.5% Triton for 5 min, blocked with PBS/5% BSA and incubated at 4 °C with primary antibody overnight. AlexaFluor-conjugated

secondary antibodies were diluted in PBS/2%BSA (1:500, LIFE TECHNOLOGIES, Oregon, USA) and incubated for 1 h at room temperature. Nuclei were stained for 2 min with DAPI (1 µg/ml). Only cells with healthy nuclear morphology (non-apoptotic) were quantified.

Brain section

Wistar rat male brains 4 or 25 months old were isolated following IACUC guidelines. Rats were perfused transcardially with PBS, then with 4% paraformaldehyde. Brains were drop-fixed in 4% paraformaldehyde for 24h; for cryoprotection brains were immersed in PBS/30% sucrose for 24 h. Brain coronal sections (50 µm) from frontal cortex were mounted serially. The sections were permeabilized with PBS/ 0.3% Triton for 15 min, blocked with PBS/5% BSA for 1 hour at room temperature and incubated with primary antibody at 4 °C overnight in PBS/1% BSA. Next, sections were incubated with AlexaFluor-conjugated secondary antibodies (1:350, LIFE TECHNOLOGIES, Oregon, USA) in PBS / 2% BSA 1 h at room temperature; nuclei were stained with DAPI (1 µg/ml). To avoid lipofuscin autofluorescence slices were incubated with Sudan Black B.

The following primary antibodies were used: mouse anti class III β-TUBULIN (1:1000, ABCAM 14545, Cambridge, MA, USA), rabbit anti class III β-TUBULIN (1:1000, ABCAM 18207, Cambridge, MA, USA), rabbit anti- class III β-TUBULIN (1:500, BIOLEGEND, MRB435P-100, San Diego, CA, USA), rabbit anti-GFAP (1:1000, DAKO Z0334, Santa Clara, CA, USA), rat anti-GFAP (1:1000, INVITROGEN 13-0300, Camarillo, CA, USA), rabbit anti-p21 (1:25, ABCAM 7960 or 1:100 ABCAM 109199, Cambridge, MA, USA), mouse anti-γH2AX (1:500, ABCAM 26350, Cambridge, MA, USA), rabbit anti-LC3 (1:500, MBL PD014, Nagoya, Japan), mouse anti-p62 (1:300, ABCAM 56416, Cambridge, MA, USA), rabbit anti-LAMP1 (1:1000, SIGMA-ALDRICH L1418, St. Louis, MO, USA), rabbit anti-mTOR (1:200, CELL SIGNALING 2983, Beverly, MA, USA), rabbit anti-GATA4 (1:500, ABCAM 84593, Cambridge, MA, USA).

Images were acquired using a NIKON ECLIPSE Ti-U microscope or a confocal microscope Zeiss LSM 800. Images were processed using NIS Elements, Basic Research (NIKON INSTRUMENTS Inc ©, NY, USA) software, Version 3.13 or Fiji software.

Immunoelectron microscopy

Cortical cells were fixed with 3% glutaraldehyde. Following fixation, dehydration was performed in an

ethanol gradient: 30-40-50-60-70-80-90-100 % ethanol at 4°C. Then, the cells were embedded in a LR White resin and polymerization was carried out at 50 °C. Ultrathin sections of 70-80 nm were cut from the polymer using an Ultracut-Recheirt-Jung and placed on nickel grids for immunogold assay.

The thin sections were washed twice for 2 min with deionized water and two times with PBS with 0.005 % Tween20. Sections were then incubated for 30 min with the blocking solution (50 mM glycine, 0.005 % Tween20, 0.01 % Triton X-100 and 0.1 % BSA in PBS) [53]. After blocking, sections were incubated with the primary antibody: rabbit anti-LC3 (1:500, MBL PD014, Nagoya, Japan). After rinsing three times in PBS with 0.005 % Tween20, the sections were incubated overnight at 4 °C with the secondary antibody: donkey anti-rabbit 25-nm gold conjugate (Electron Microscopy Science Aurion #25708). Samples were washed three times with PBS, 0.005 % Tween20 and post-fixed in 2 % glutaraldehyde in PBS for 10 min. The sections were then rinsed with distilled water twice for 5 min and contrasted with 2 % uranyl acetate, rinsed with water, dried and observed under a JEOL JEM 1200 EXII electron microscope.

Immunoblotting analysis

Cells grown in the presence or absence of 20 µM Chloroquine (C-6628 SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA) for 4 hrs were lysed in an extraction buffer consisting of 25 mM Tris, 50 mM NaCl, 2% Igepal, 0.2% SDS and 2 mg/ml protease inhibitor 18 (Complete, Roche Molecular Diagnostics, pH 7.4). Thirty micrograms of total protein were separated by SDS-PAGE and electroblotted onto polyvinylidene fluoride (PVDF-FL) membranes (Millipore). Membranes were incubated overnight with the primary antibody at 4 °C, rabbit anti-LC3 (1:1000, MBL PD014, Nagoya, Japan), rabbit anti-p62 (1:500, CELL SIGNALING 5114S, Beverly, MA, USA), mouse anti-TUBULIN (1:10000, CELL SIGNALING 3873, Beverly, MA, USA). Following three washes with TTBS secondary antibody IRDye® 680RD goat anti-rabbit (925-68071, LI-COR) or IRDye® 800CW goat anti-mouse (925-32210, LI-COR) was applied at 1:10,000 dilution in TTBS. Membranes were scanned and analyzed using an Odyssey® IR scanner and Odyssey® Image Studio software 5.2.5.

Gene expression analysis

Total RNA was isolated using TRIzol™ reagent (Life Technologies), and cDNA was synthesized from 1 µg of RNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific #4368814).

The quantitative PCR (qPCR) reaction was performed with the SYBR Green mix (Kapa SYBR® Fast Universal #KK4602) in the Rotor-Gene Q thermocycler (Qiagen, Germantown, MD, USA). All reactions were performed in quadruplicate, and the expression was normalized using the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*) mRNA. The sequences of the primers used are as follows:

Cdkn1a F 5'-CCGAGAACGGTGGAACTTTGAC-3';
Cdkn1a R 5'-GAACACGCTCCCAGACGTAGTTG-3'
Ccl2 (*Mcp-1*) F, 5'-ATGCAGTTAATGCCCACTC;
Ccl2 (*Mcp-1*) R, 5'-TTCCTTATTGGGGTCAGCAC-3'
Gapdh F, 5'-CTCATGACCACAGTCCATGC-3'
Gapdh R, 5'-TTCAGCTCTGGGATGACCTT-3'.

Neutral Comet assay

Cells were resuspended in cold PBS at 10^3 cells/ μ L density. This suspension was mixed at a 1:5 ratio with 0.75% low-melting point agarose (BIO RAD Certified™ Low Melt Agarose #1613111, Hercules, California, USA) at 37°C. About 50 to 100 μ L of the mix were placed on microscope slides pre-coated with 1% normal-melting point agarose (BIO RAD Certified™ PCR Agarose #1613103, Hercules, California, USA), spread with coverslips and incubated at 4°C for 2 min and 10 min more at room temperature. The coverslips were removed and slides were covered with pre-chilled lysis solution (0.03 M EDTA, 1% SDS) for 60 min at 4°C. After that, slides were washed and covered with unwinding/electrophoresis buffer (Tris 60 mM, Acetic acid 90 mM, EDTA 2.5 mM, pH 9.0) for 60 min. Electrophoresis was performed at 25 V for 20 min. Immediately, slides were rinsed and incubated for 10 min in neutralization buffer (Tris-HCl 500 mM, pH 7.5) 3 times. Finally, DNA was stained with SYBR green (SYBR™ green I Nucleic Acid Gel Stain, INVITROGEN™, Eugene, Oregon, USA) 1:10000 in PBS. For each sample 50 comet images were measured, using a Nikon ECLIPSE Ti-U fluorescence microscope. The length and area of the broken DNA were measured with NIS Elements Basic Research software (NIKON INSTRUMENTS Inc ©, NY, USA).

SASP analysis of cortical cells

Conditioned medium was collected from neuronal cultures at 6, 26 and 40 days *in vitro* (DIV) and was frozen at -20 °C until use. Concentrations (pg/mL) of G-CSF, GM-CSF, IFN γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, TNF α , Eotaxin, Gro α , IP-10, MCP-1, MCP-3, MIP-1 α , MIP-2 and RANTES in media conditioned by cortical cells were measured by ProcartaPlex® Multiplex Immunoassay (BIO RAD # 171K1002M). The

conditioned medium was previously concentrated using centrifugal filter units Amicon Ultracel-3 kDa (Millipore # UFC800324) and a total of 50 μ L of concentrated conditioned medium were examined following manufacturer's instructions. Data were obtained in a Luminex Instrument and the analytes concentration was measured calibrating with a standard curve for each cytokine provided by the manufacturer.

Cyto-ID autophagosomes detection and LysoTracker staining

The Cyto-ID (ENZO LIFE SCIENCES ENZ-51031-K200, Farmingdale, NY, USA) is an 488 nm-excitable green fluorescent reagent that specifically accumulates in autophagic vesicles. Cells were incubated in Cyto-ID (1 μ L Cyto-ID/1ml cell culture medium) for 30 minutes at 37 °C, 5 % CO₂ and washed prior to analysis. LysoTracker dye (DND-99 LIFE TECHNOLOGIES, Oregon, USA) was incubated for 20 min at 37°C. Cells were analyzed by Fluorescence Nikon ECLIPSE Ti-U microscope.

Cortical cells-derived conditioned medium collection and treatment

Conditioned medium was prepared by collecting half the medium from neuronal cultures at 6, 26 and 40 days *in vitro* (DIV) and freezing it at -20°C until use. Conditioned media were diluted 3:1 with fresh medium and added to cells at 1 DIV in 12-well plates (4×10^5 cortical neurons cells/well; 1×10^4 MEFs/well). For MEFs, to avoid adding unknown factors from serum, conditioned media were diluted with OptiMEM (GIBCO Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Cells were incubated further for 6 days at 37°C and 5 % CO₂. At the end of incubation, the senescent markers were analyzed.

Quantification

The quantifications of cells with a particular phenotype were done using NIS Elements, Basic Research (NIKON INSTRUMENTS Inc ©, NY, USA) Version 3.13 software or Fiji software. The size of the samples analyzed is indicated in every figure legend. We counted at least 100 cells in each graph shown. To quantify data that corresponds to nuclear Lamin A/C invagination (Figure 4), we exploited the observation that internal Lamin A/C invaginations increase the signal intensity of intranuclear Lamin A/C that would otherwise be in the nuclear envelope as follows: Z-Stacked maximum intensity confocal images were utilized. Border ROIs were manually selected with the brush selection tool of FIJI, the brush size corresponded to the pixel number length closest to 500 nm, roughly

the nuclear envelope size (i.e. 101.41 μm x 101.41 μm 1024 pixels x 1024 pixels images required a brush of pixel size 5 and 1437 pixels x 1437 pixels images of the same metric size required a brush of pixel size 7). Border ROIs were selected manually including the most distal from the center of the nucleus signal of DAPI stained nuclei forming ring like ROIs. Central ROIs were selected to be exactly the internal part of the ring excluded from the border ROIs by using the clear outside function on the edit menu followed clicking on the internal part with the wand (tracing) tool of FIJI. The mean fluorescence intensity of these ROIs in Lamin A/C images was measured and the signal of the center was divided by the signal of the border so as to normalize for different Lamin A/C expression. Higher values correspond to more invagination.

Statistical Analysis.

All data were analyzed and graphed with Prism 6 (GraphPad Software Inc. La Jolla, CA, USA). Specific tests were performed according to each experimental design, and are indicated in each figure.

Abbreviations

BECN1: Beclin 1; CQ: Cloroquine; DAPI: 4',6-Diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride; DDR: DNA Damage Response; *DIV*: Days *in vitro*; FM: Fresh medium; GFAP: Glial fibrillary acidic protein; IL6: Interleukin-6; LAMP: Lysosomal-associated membrane protein; MEFs: Mouse embryonic fibroblasts; mH2A: Histone macroH2A; mTOR: mechanistic target of rapamycin; N2A: Neuro 2A; PI3KC3: Phosphatidylinositol 3-kinase class 3; p38MAPK: p38 mitogen-activated protein kinase; SA- β -gal: Senescence-Associated β -galactosidase; SAHF: Senescence-associated heterochromatin foci; SAMP8: senescence-accelerated mice prone; SASP: Senescence-associated secretory phenotype; SBB: Sudan Black B; Spautin-1: Specific and potent autophagy inhibitor 1; SQSTM1: Sequestosome 1; TASC: TOR-autophagy spatial coupling compartment; TGF β : Transforming growth factor-beta; Tre: Trehalose; 53BP1: p53-binding protein 1; MCP-1: monocyte chemotactic protein 1; official name C-C motif chemokine 2; GATA4: GATA binding protein 4.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

DMB carried out most of the experiments and participated in project design. EGS characterized neuronal senescence in the cortex of old rat brains; APA studied the paracrine premature senescence on MEFs; LAM and MK analyzed SASP components; GMH analyzed the double strand DNA brakes in senescent neurons; CGO performed lysotracker staining and

contributed to autophagy analysis; LM contributed to experimental design and data analysis. SCO conceived the study and wrote the manuscript. All authors edited and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We are thankful to Dr. Beatriz Aguilar for her technical assistance. We acknowledge the support given by M.Sc. Ana Maria Escalante and Francisco Pérez at the IT Unit and Claudia Rivero at the Animal Facility. We are thankful to Dr. Ruth Rincón for confocal analysis assistance, to M.Sc. Rodolfo Paredes for electron microscopy imaging and to Dr. Abraham Rosas for both confocal analysis and electron microscopy imaging, all at the Imagenology Unit. Data in this work are part of the doctoral dissertation in the "Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas" at the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) of DMB and GMH, of the doctoral dissertation of EGS in the "Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas" at UNAM, and of the master dissertation in the "Programa de Maestría en Ciencias Bioquímicas" at UNAM of APA. All are recipients of fellowships from CONACyT.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

FUNDING

This project was supported by a grant from the Secretaria de Educación, Ciencia, Tecnología e Innovación de la Ciudad de México SECITI/042/2018 (INGER-DI-CRECITES-008-2018) "Red Colaborativa de Investigación Traslacional para el Envejecimiento Saludable de la Ciudad de México (RECITES)"; by CONACyT FC-921 and CB2013-220515; and by UNAM-PAPIIT IN206015-IN206518 to SCO. DMB received CONACyT doctoral fellowship 588372; GMH received CONACyT doctoral fellowship 417724; EGS received CONACyT doctoral fellowship 586932 and APA received CONACyT master fellowship 485243.

REFERENCES

1. Soto-Gamez A, Demaria M. Therapeutic interventions for aging: the case of cellular senescence. *Drug Discov Today*. 2017; 22:786–95. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.01.004> PMID:28111332
2. Muñoz-Espín D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014; 15:482–96. <https://doi.org/10.1038/nrm3823> PMID:24954210

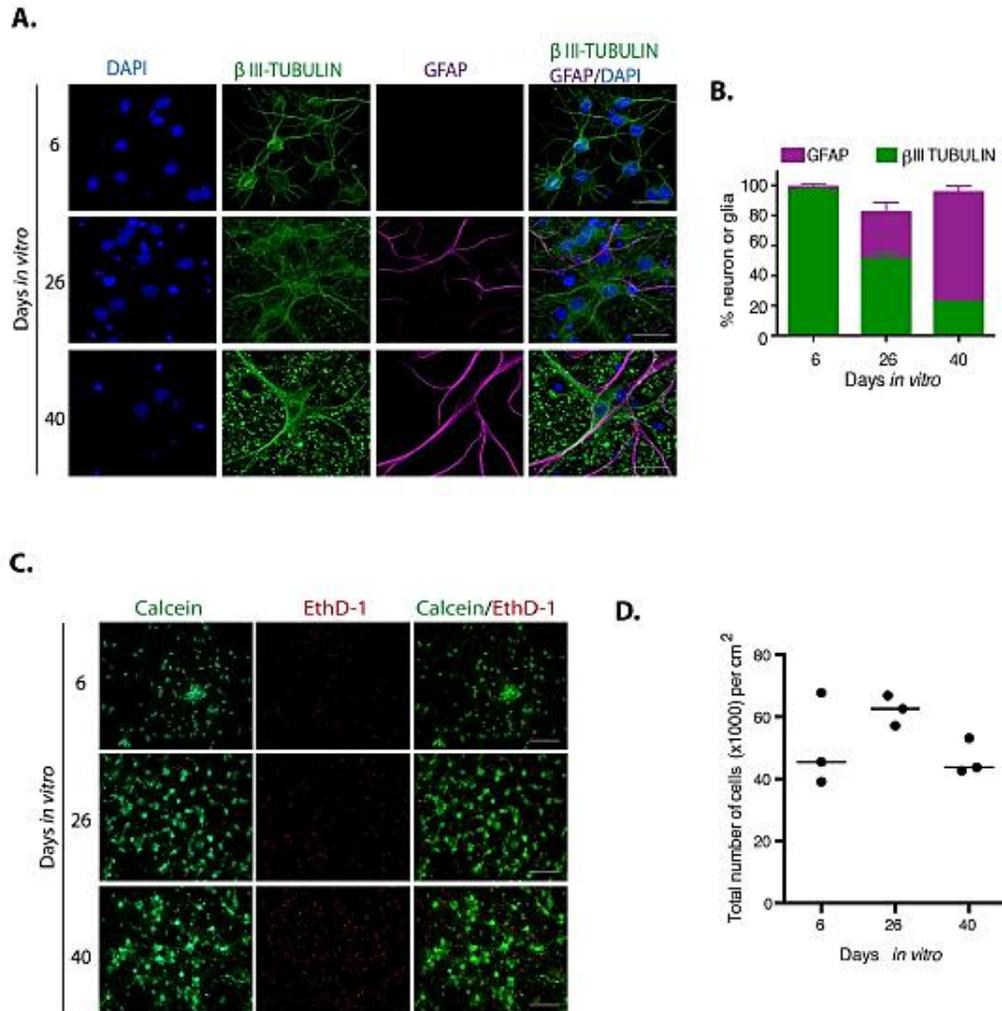
3. Matjusaitis M, Chin G, Sarnoski EA, Stolzing A. Biomarkers to identify and isolate senescent cells. *Ageing Res Rev.* 2016; 29:1–12. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.05.003> PMID:27212009
4. Lenain C, Gussyatiner O, Douma S, van den Broek B, Peeper DS. Autophagy-mediated degradation of nuclear envelope proteins during oncogene-induced senescence. *Carcinogenesis.* 2015; 36:1263–74. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgv124> PMID:26354777
5. Acosta JC, Banito A, Wuestefeld T, Georgilis A, Janich P, Morton JP, Athineos D, Kang TW, Lasitschka F, Andrusis M, Pascual G, Morris KJ, Khan S, et al. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol.* 2013; 15:978–90. <https://doi.org/10.1038/ncb2784> PMID:23770676
6. Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol.* 2010; 5:99–118. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-121808-102144> PMID:20078217
7. Sieben CJ, Sturmlechner I, van de Sluis B, van Deursen JM. Two-Step Senescence-Focused Cancer Therapies. *Trends Cell Biol.* 2018; 28:723–37. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.04.006> PMID:29776716
8. Kang HT, Lee KB, Kim SY, Choi HR, Park SC. Autophagy impairment induces premature senescence in primary human fibroblasts. *PLoS One.* 2011; 6:e23367. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023367> PMID:21858089
9. Young AR, Narita M, Ferreira M, Kirschner K, Sadaie M, Darot JF, Tavaré S, Arakawa S, Shimizu S, Watt FM, Narita M. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev.* 2009; 23:798–803. <https://doi.org/10.1101/gad.519709> PMID:19279323
10. Kang C, Xu Q, Martin TD, Li MZ, Demaria M, Aron L, Lu T, Yankner BA, Campisi J, Elledge SJ. The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4. *Science.* 2015; 349:aaa5612. <https://doi.org/10.1126/science.aaa5612> PMID:26404840
11. 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. Spatial coupling of mTOR and autophagy augments secretory phenotypes. *Science.* 2011; 332:966–70. <https://doi.org/10.1126/science.1205407> PMID:21512002
12. Kang C, Elledge SJ. How autophagy both activates and inhibits cellular senescence. *Autophagy.* 2016; 12:898–99. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1121361> PMID:27129029
13. Chinta SJ, Woods G, Rane A, Demaria M, Campisi J, Andersen JK. Cellular senescence and the aging brain. *Exp Gerontol.* 2015; 68:3–7. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.09.018> PMID:25281806
14. Walton CC, Andersen JK. Unknown fates of (brain) oxidation or UFO: close encounters with neuronal senescence. *Free Radic Biol Med.* 2019; 134:695–701. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.012> PMID:30639615
15. Jurk D, Wang C, Miwa S, Maddick M, Korolchuk V, Tzolou A, Gonos ES, Thrasivoulou C, Saffrey MJ, Cameron K, von Zglinicki T. Postmitotic neurons develop a p21-dependent senescence-like phenotype driven by a DNA damage response. *Aging Cell.* 2012; 11:996–1004. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2012.00870.x> PMID:22882466
16. Chernova T, Nicotera P, Smith AG. Heme deficiency is associated with senescence and causes suppression of N-methyl-D-aspartate receptor subunits expression in primary cortical neurons. *Mol Pharmacol.* 2006; 69:697–705. <https://doi.org/10.1124/mol.105.016675> PMID:16306232
17. Bhanu MU, Mandraju RK, Bhaskar C, Kondapi AK. Cultured cerebellar granule neurons as an in vitro aging model: topoisomerase II β as an additional biomarker in DNA repair and aging. *Toxicol In Vitro.* 2010; 24:1935–45. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.08.003> PMID:20708677
18. Dong W, Cheng S, Huang F, Fan W, Chen Y, Shi H, He H. Mitochondrial dysfunction in long-term neuronal cultures mimics changes with aging. *Med Sci Monit.* 2011; 17:BR91–96. <https://doi.org/10.12659/MSM.881706> PMID:21455101
19. Geng YQ, Guan JT, Xu XH, Fu YC. Senescence-associated beta-galactosidase activity expression in aging hippocampal neurons. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 396:866–69. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.05.011> PMID:20457127

20. Xu T, Sun L, Shen X, Chen Y, Yin Y, Zhang J, Huang D, Li W, Li W. NADPH oxidase 2-mediated NLRP1 inflammasome activation involves in neuronal senescence in hippocampal neurons in vitro. *Int Immunopharmacol.* 2019; 69:60–70. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.01.025> PMID:30677569
21. Piechota M, Sunderland P, Wysocka A, Nalberczak M, Sliwiska MA, Radwanska K, Sikora E. Is senescence-associated β -galactosidase a marker of neuronal senescence? *Oncotarget.* 2016; 7:81099–109. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12752> PMID:27768595
22. Bigagli E, Luceri C, Scartabelli T, Dolara P, Casamenti F, Pellegrini-Giampietro DE, Giovannelli L. Long-term Neuroglial Cocultures as a Brain Aging Model: Hallmarks of Senescence, MicroRNA Expression Profiles, and Comparison With In Vivo Models. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2016; 71:50–60. <https://doi.org/10.1093/gerona/glu231> PMID:25568096
23. Jin HJ, Lee HJ, Heo J, Lim J, Kim M, Kim MK, Nam HY, Hong GH, Cho YS, Choi SJ, Kim IG, Shin DM, Kim SW. Senescence-Associated MCP-1 Secretion Is Dependent on a Decline in BMI1 in Human Mesenchymal Stromal Cells. *Antioxid Redox Signal.* 2016; 24:471–85. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6359> PMID:26573462
24. Georgakopoulou EA, Tsimaratou K, Evangelou K, Fernandez-Marcos PJ, Zoumpourlis V, Trougakos IP, Kletsas D, Bartek J, Serrano M, Gorgoulis VG. 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).* 2013; 5:37–50. <https://doi.org/10.18632/aging.100527> PMID:23449538
25. García-Aguirre I, Alamillo-Iniesta A, Rodríguez-Pérez R, Vélez-Aguilera G, Amaro-Encarnación E, Jiménez-Gutiérrez E, Vásquez-Limeta A, Samuel Laredo-Cisneros M, Morales-Lázaro SL, Tiburcio-Félix R, Ortega A, Magaña JJ, Winder SJ, Cisneros B. Enhanced nuclear protein export in premature aging and rescue of the progeria phenotype by modulation of CRM1 activity. *Aging Cell.* 2019:e13002. [Epub ahead of print] <https://doi.org/10.1111/acel.13002> PMID:31305018
26. Freund A, Laberge RM, Demaria M, Campisi J. Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Mol Biol Cell.* 2012; 23:2066–75. <https://doi.org/10.1091/mbc.e11-10-0884> PMID:22496421
27. Takamori Y, Tamura Y, Kataoka Y, Cui Y, Seo S, Kanazawa T, Kurokawa K, Yamada H. Differential expression of nuclear lamin, the major component of nuclear lamina, during neurogenesis in two germinal regions of adult rat brain. *Eur J Neurosci.* 2007; 25:1653–62. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05450.x> PMID:17432957
28. Lee JY, Yu KR, Lee BC, Kang I, Kim JJ, Jung EJ, Kim HS, Seo Y, Choi SW, Kang KS. GATA4-dependent regulation of the secretory phenotype via MCP-1 underlies lamin A-mediated human mesenchymal stem cell aging. *Exp Mol Med.* 2018; 50:63. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0092-3> PMID:29760459
29. Rubinsztein DC, Mariño G, Kroemer G. Autophagy and aging. *Cell.* 2011; 146:682–95. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.030> PMID:21884931
30. Yang F, Chu X, Yin M, Liu X, Yuan H, Niu Y, Fu L. mTOR and autophagy in normal brain aging and caloric restriction ameliorating age-related cognition deficits. *Behav Brain Res.* 2014; 264:82–90. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.02.005> PMID:24525424
31. 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, et al. Beclin1 controls the levels of p53 by regulating the deubiquitination activity of USP10 and USP13. *Cell.* 2011; 147:223–34. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.037> PMID:21962518
32. Mayer AL, Higgins CB, Heitmeier MR, Kraft TE, Qian X, Crowley JR, Hyrc KL, Beatty WL, Yarasheski KE, Hruz PW, DeBosch BJ. SLC2A8 (GLUT8) is a mammalian trehalose transporter required for trehalose-induced autophagy. *Sci Rep.* 2016; 6:38586. <https://doi.org/10.1038/srep38586> PMID:27922102
33. Song J, Lee B, Kang S, Oh Y, Kim E, Kim CH, Song HT, Lee JE. Agmatine Ameliorates High Glucose-Induced Neuronal Cell Senescence by Regulating the p21 and p53 Signaling. *Exp Neurobiol.* 2016; 25:24–32. <https://doi.org/10.5607/en.2016.25.1.24> PMID:26924930
34. Riessland M, Kolisnyk B, Kim TW, Cheng J, Ni J, Pearson JA, Park EJ, Dam K, Acehan D, Ramos-Espiritu LS, Wang W, Zhang J, Shim J, et al. Loss of SATB1 Induces a p21 Dependent Cellular Senescence Phenotype in Dopaminergic Neurons. *bioRxiv.* 2018; 452243. 10.1101/452243
35. Narita M, Young AR, Narita M. Autophagy facilitates oncogene-induced senescence. *Autophagy.* 2009;

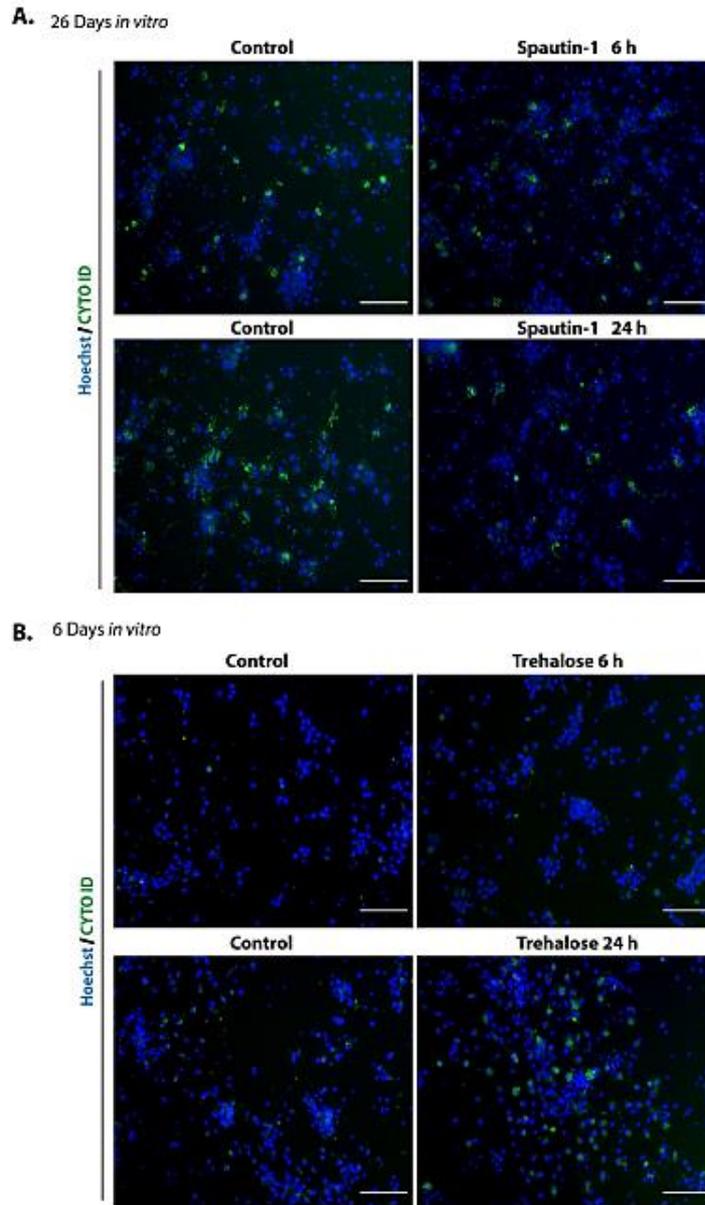
- 5:1046–47. <https://doi.org/10.4161/auto.5.7.9444> PMID:[19652542](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19652542/)
36. Golde TE, Miller VM. Proteinopathy-induced neuronal senescence: a hypothesis for brain failure in Alzheimer's and other neurodegenerative diseases. *Alzheimers Res Ther.* 2009; 1:5. <https://doi.org/10.1186/alzrt5> PMID:[19822029](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19822029/)
 37. Franceschi C, Campisi J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2014 (Suppl 1); 69:S4–9. <https://doi.org/10.1093/gerona/glu057> PMID:[24833586](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24833586/)
 38. McShea A, Harris PL, Webster KR, Wahl AF, Smith MA. Abnormal expression of the cell cycle regulators P16 and CDK4 in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 1997; 150:1933–39. PMID:[9176387](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9176387/)
 39. Lüth HJ, Holzer M, Gertz HJ, Arendt T. Aberrant expression of nNOS in pyramidal neurons in Alzheimer's disease is highly co-localized with p21ras and p16INK4a. *Brain Res.* 2000; 852:45–55. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)02178-2](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)02178-2) PMID:[10661494](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10661494/)
 40. Luterman JD, Haroutunian V, Yemul S, Ho L, Purohit D, Aisen PS, Mohs R, Pasinetti GM. Cytokine gene expression as a function of the clinical progression of Alzheimer disease dementia. *Arch Neurol.* 2000; 57:1153–60. <https://doi.org/10.1001/archneur.57.8.1153> PMID:[10927795](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10927795/)
 41. Sun A, Liu M, Nguyen XV, Bing G. P38 MAP kinase is activated at early stages in Alzheimer's disease brain. *Exp Neurol.* 2003; 183:394–405. [https://doi.org/10.1016/S0014-4886\(03\)00180-8](https://doi.org/10.1016/S0014-4886(03)00180-8) PMID:[14552880](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14552880/)
 42. Campbell IL, Abraham CR, Masliah E, Kemper P, Inglis JD, Oldstone MB, Mucke L. Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90:10061–65. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.21.10061> PMID:[7694279](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7694279/)
 43. Bussian TJ, Aziz A, Meyer CF, Swenson BL, van Deursen JM, Baker DJ. Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline. *Nature.* 2018; 562:578–82. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0543-y> PMID:[30232451](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30232451/)
 44. Musi N, Valentine JM, Sickora KR, Baeuerle E, Thompson CS, Shen Q, Orr ME. Tau protein aggregation is associated with cellular senescence in the brain. *Aging Cell.* 2018; 17:e12840. <https://doi.org/10.1111/ace1.12840> PMID:[30126037](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30126037/)
 45. Martinez-Lopez N, Athonvarangkul D, Singh R. Autophagy and aging. *Adv Exp Med Biol.* 2015; 847:73–87. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2404-2_3 PMID:[25916586](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25916586/)
 46. Gelino S, Hansen M. Autophagy - An Emerging Anti-Aging Mechanism. *J Clin Exp Pathol.* 2012 (Suppl 4); Suppl 4:006. PMID:[23750326](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23750326/)
 47. Madeo F, Zimmermann A, Maiuri MC, Kroemer G. Essential role for autophagy in life span extension. *J Clin Invest.* 2015; 125:85–93. <https://doi.org/10.1172/JCI73946> PMID:[25654554](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25654554/)
 48. Gerónimo-Olvera C, Montiel T, Rincon-Heredia R, Castro-Obregón S, Massieu L. Autophagy fails to prevent glucose deprivation/glucose reintroduction-induced neuronal death due to calpain-mediated lysosomal dysfunction in cortical neurons. *Cell Death Dis.* 2017; 8:e2911. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.299> PMID:[28661473](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28661473/)
 49. Xu J. Preparation, culture, and immortalization of mouse embryonic fibroblasts. *Curr Protoc Mol Biol.* 2005; Chapter 28:Unit 28.1. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb2801s70> PMID:[18265366](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18265366/)
 50. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92:9363–67. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.20.9363> PMID:[7568133](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7568133/)
 51. Debacq-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, Toussaint O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc.* 2009; 4:1798–806. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.191> PMID:[20010931](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20010931/)
 52. Levitsky KL, Toledo-Aral JJ, López-Barneo J, Villadiego J. Direct confocal acquisition of fluorescence from X-gal staining on thick tissue sections. *Sci Rep.* 2013; 3:2937. <https://doi.org/10.1038/srep02937> PMID:[24121824](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24121824/)
 53. Rosas-Arellano A, Villalobos-González JB, Palma-Tirado L, Beltrán FA, Cárabaz-Trejo A, Missirlis F, Castro MA. A simple solution for antibody signal enhancement in immunofluorescence and triple immunogold assays. *Histochem Cell Biol.* 2016; 146:421–30. <https://doi.org/10.1007/s00418-016-1447-2> PMID:[27188756](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27188756/)

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Figures



Supplementary Figure 1S. Rat prenatal cortex primary culture is viable up to 40 days *in vitro* (DIV). (A) Representative immunofluorescence used to quantify neurons (β III-TUBULIN) and glial cells (GFAP) at 6, 26 or 40 DIV as indicated. Nuclei were stained with DAPI. Scale bars represent 25 μ m. (B) The percentage of neurons or glial cells along the culture is graphed. It changes along the time of culture due to both neuronal death and glial proliferation. Bars represent SEM, n=3. (C) Cell viability was estimated by staining with LIVE/DEAD viability/cytotoxicity kit. Alive cells were stained with Calcein, while dead cells were stained with Ethidium homodimer-1 (EthD-1). Scale bars represent 500 μ m. (D) The total number of cells per square cm remained similar along the culture. Each dot represents the average of three wells per experiment. Bars represent the average of three independent experiments. Although there was an increment in the average number of cells at 26 DIV, it was not statistically significant analyzed by two-way RM ANOVA, with Dunnett's multiple comparison test.



Supplementary Figure 2S. Spautin-1 inhibited autophagy and Trehalose induced autophagy on cortical primary cells. (A) Autophagosomes were stained with CytoID® to verify Spautin1 inhibition of autophagy on cortical cells cultured for 26 DIV, since at this time cells have abundant autophagosomes. Controls were treated with vehicle only. (B) Trehalose induction of autophagy was verified by adding it to cortical cells cultured for 6 DIV, since at this time cortical cells have only few autophagosomes. Controls were treated with vehicle only. Nuclei were stained with Hoechst. Scale bars represent 500 µm.