



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

Estudio del papel de MLKL en las alteraciones lisosomales  
durante la senescencia neuronal

## TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE  
**MAESTRA EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

PAULINA LÓPEZ CARRASCO

TUTOR PRINCIPAL:

DRA. SUSANA CASTRO OBREGÓN  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. MINA KONIGSBERG FAINSTEIN  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA, UNIDAD  
IZTAPALAPA

DR. JULIO EDUARDO ROQUE MORÁN ANDRADE  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR



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.

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Destino Celular en el Desarrollo y Envejecimiento del 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 1145550, del “Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado” (PAEP), y del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM IN209221.

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

A la Doctora Susana Castro Obregón por la dirección de este trabajo, por compartirme sus conocimientos, por abrirme las puertas de su laboratorio y por su disposición a escuchar y discutir nuevas ideas.

A la Doctora Mina Königsberg y al Doctor Julio Morán, integrantes de mi comité tutorial. Gracias por su tiempo y contribuciones para el desarrollo de este proyecto.

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

Al Dr. Abraham Rosas Arellano y la Dra. Ruth Rincón Heredia de la Unidad de Microscopia del IFC por su ayuda y enseñanzas para la obtención y análisis de imágenes de microscopia confocal.

Al Dr. Arturo Jiménez Sánchez del Instituto de Química de la UNAM y a su grupo de trabajo, por la donación de la molécula AztecLysopH.

Al Doctor Jorge Peón Peralta y la Q. Mariana Mejía Reza del Instituto de Química de la UNAM, por su tiempo, disposición, atenciones y valiosas enseñanzas para llevar a cabo la obtención y el análisis de imágenes con microscopia de tiempo de vida de fluorescencia

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

A la M.V.Z Claudia Rivera Cerecedo y la Unidad del Bioterio del IFC.

A la comunidad del IFC por su apoyo para conseguir reactivos, equipo o material que necesitaba para realizar mis experimentos.

Al “Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado” (PAEP) por el apoyo brindado para mi asistencia al XXXVIII Congreso Nacional de Bioquímica que se llevó a cabo en la ciudad de Mérida en Yucatán.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

En primer lugar, a mi mamá por el apoyo incondicional que me ha brindado en todo momento para alcanzar mis metas. Gracias por tu cariño, ejemplo y enseñanzas. Yo sé que si hubiera querido ser astronauta hubieras aprendido a armar cohetes.

A mi familia por su cariño durante todo este camino.

A la Doctora Clorinda Arias, por permitirme aprender de ella, gracias por los buenos momentos y la confianza. A Liz, Vale, Marthis, Manu y César por ser mi ejemplo a seguir y por tantos momentos de formación, aprendizaje y diversión dentro y fuera del lab.

A la Doctora Soledad Funes por sus consejos y su apoyo. A Arián, Ernesto, Hernán e Hilario por el cafecito, los dulces, las risas y las pláticas ñoñas.

A mis amigos del laboratorio Lore, Bere, Lau, Pili, Alfred y Braulio. Gracias por sus comentarios, detalles y por cooperar con mis dinámicas de integración.

A Brenda, Euge, Víctor que después de tantos años siguen conmigo, me llena de alegría seguir teniéndolos cerca y compartir con ustedes sueños y metas cumplidas.

A Mariana por enseñarme a usar un flexómetro y salvar mi tesis.

A todos aquellos que me acompañan o acompañaron con una sonrisa, palabras de ánimo o un abrazo en el momento justo.

## Índice

<b>1</b>	<b>Abstract</b> .....	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>Resumen</b> .....	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	<b>9</b>
<b>4</b>	<b>Introducción</b> .....	<b>10</b>
4.1	<i>Senescencia celular</i> .....	10
4.1.1	Vías de activación de la senescencia.....	12
4.2	<i>Función y morfología lisosomal</i> .....	14
4.2.1	Biogénesis, maduración y reformación lisosomal.....	16
4.2.2	Cambios en la estructura y función lisosomal durante el envejecimiento .....	17
4.3	<i>Autofagia</i> .....	20
4.3.1	Macroautofagia.....	21
4.3.2	Macroautofagia en neuronas.....	23
4.4	<i>Vía de señalización RIPK1-RIPK3-MLKL</i> .....	26
4.4.1	Funciones no canónicas de MLKL.....	27
<b>5</b>	<b>Antecedentes</b> .....	<b>28</b>
<b>6</b>	<b>Hipótesis</b> .....	<b>29</b>
<b>7</b>	<b>Objetivo General</b> .....	<b>29</b>
<b>8</b>	<b>Objetivos particulares</b> .....	<b>30</b>
<b>9</b>	<b>Material y métodos</b> .....	<b>30</b>
9.1	<i>Cultivo de neuronas corticales de rata Wistar</i> .....	30
9.1.2	Tratamientos con necrostatina .....	31
9.2	<i>Tinción con lysotracker para estudiar morfología lisosomal</i> .....	31
9.2.1	Cuantificación y clasificación de lisosomas .....	31
9.3	<i>Medición de pH lisosomal</i> .....	32
9.3.1	Tinción con AzteclysopH.....	32
9.3.2	Tinción con Lysosensor yellow/blue DND90 .....	33
9.4	<i>Inmunofluorescencia</i> .....	34
9.5	<i>Análisis estadístico</i> .....	34
<b>10</b>	<b>Resultados</b> .....	<b>35</b>
10.1	<i>Los lisosomas agrandados y de baja circularidad incrementan en el soma de neuronas corticales conforme se van volviendo senescentes</i> .....	35
10.2	<i>La acidez de los lisosomas incrementó en neuronas senescentes</i> .....	37
10.3	<i>La inhibición de RIPK1 con necrostatina, aunque también el tratamiento con DMSO, evitaron el incremento de la acidez de los lisosomas agrandados en neuronas senescentes</i> .....	45
10.4	<i>pMLKL se distribuye en la cercanía de los lisosomas agrandados</i> .....	49
<b>11</b>	<b>Discusión</b> .....	<b>50</b>
<b>12</b>	<b>Conclusión</b> .....	<b>53</b>
<b>13</b>	<b>Perspectivas</b> .....	<b>53</b>

<b>14</b>	<b>Anexos.....</b>	<b>54</b>
14.1	<i>Materiales y reactivos.....</i>	<i>54</i>
14.2	<i>Componentes del medio Neurobasal complementado .....</i>	<i>55</i>
14.3	<i>Cultivo primario de neuronas corticales.....</i>	<i>55</i>
14.4	<i>Obtención de imágenes de lisosomas teñidos con Lysotracker y procesamiento .....</i>	<i>58</i>
14.5	<i>Estandarización Azteclyso<sup>pH</sup> en cultivo primario de neuronas corticales de rata .....</i>	<i>59</i>
<b>15</b>	<b>Bibliografía .....</b>	<b>60</b>

## 1 Abstract

Aging is characterized by progressive physiological alterations that cause dysfunction in organisms and increase the likelihood of death. In aging and associated diseases, there is an increase in the number of senescent cells, which produce a senescence-associated secretory phenotype, exhibit alterations in nuclear and chromatin structure, accumulate lipofuscin, have a sustained response to DNA damage, as well as alterations in calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction. In neurons, senescence occurs due to a decrease in autophagy function, a cellular catabolic process necessary to maintain energy balance, cellular component recycling, etc.

During autophagy, macromolecules such as proteins and organelles are targeted to the lysosome for degradation. For this, the formation of autophagosomes is required, which subsequently fuse with lysosomes so that the enzymes inside can degrade the cargo. Autophagosomes and lysosomes must be transported along microtubules so that both vesicles spatially align and fusion can occur. Given the morphology of neurons, this occurs along the axon.

In models of axonal degeneration, the kinase RIPK1 and the pseudokinase MLKL induce microtubule fragmentation. In our research group, we developed an in vitro neuronal senescence model in which we observed that prior to the establishment of the senescent phenotype, microtubules fragment along the axons and lysosomes with altered morphologies accumulate, which can lead to atrophy in the autophagic flux. Preliminary results suggest that the RIPK1-RIPK3-MLKL signaling pathway is activated during neuronal senescence. The protein MLKL can inhibit autophagic flux and alter membrane structures in different parts of the cell, such as the nucleus, mitochondria, and endosomes, and its function depends on its subcellular localization, which is achieved by being transported along microtubules.

This study aimed to evaluate the contribution of MLKL to the establishment of neuronal senescence. It was observed that before the establishment of the senescent phenotype in neurons, lysosomes with morphological alterations and acidity higher than optimal accumulate, which temporally coincide with axonal fragmentation of microtubules, suggesting that their degeneration halts the transport of lysosomes. MLKL was found in the vicinity of lysosomes, so we propose that MLKL interacts with proteins involved in lysosomal pH balance, altering their morphology and function. Together, these changes could impair their fusion with autophagosomes and contribute to the atrophy of the autophagic flux that leads to neuronal senescence.



## 2 Resumen

El envejecimiento se caracteriza por alteraciones fisiológicas progresivas que provocan disfunciones en los organismos e incrementan la probabilidad de morir. En el envejecimiento y enfermedades asociadas a él, hay un aumento en el número de células senescentes, que producen un fenotipo secretor asociado a senescencia, presentan alteraciones en la estructura nuclear y de la cromatina, acumulan lipofuscina, tienen una respuesta sostenida de daño al DNA, así como alteraciones en la homeostasis de calcio y disfunción mitocondrial. En neuronas, la senescencia ocurre por la disminución de la función de la autofagia, proceso celular catabólico necesario para mantener el balance energético, reciclaje de componentes celulares, etc.

Durante la autofagia, macromoléculas como proteínas y organelos se dirigen al lisosoma para su degradación. En uno de los mecanismos de autofagia, se requiere la formación de autofagosomas, los cuales se fusionan posteriormente con los lisosomas para que las enzimas de su interior, degraden el cargo. Los autofagosomas y lisosomas deben ser transportados a lo largo de los microtúbulos para que ambas vesículas coincidan espacialmente y la fusión pueda llevarse a cabo. Dada la morfología de las neuronas esto ocurre a lo largo del axón.

En modelos de degeneración axonal, la cinasa RIPK1 y la pseudocinasa MLKL, inducen la fragmentación de microtúbulos. En nuestro grupo de investigación desarrollamos un modelo de senescencia neuronal *in vitro* en el que observamos que previo al establecimiento del fenotipo senescente se fragmentan los microtúbulos a lo largo de los axones y se acumulan lisosomas con morfologías alteradas, lo que puede generar atrofia en el flujo autofágico. Resultados preliminares sugieren que la vía de señalización RIPK1-RIPK3-MLKL se activa durante la senescencia neuronal. La proteína MLKL puede inhibir el flujo autofágico y alterar la estructura de membranas en diferentes partes de la célula, como el núcleo, mitocondrias y endosomas, y su función depende de su localización subcelular la cual es alcanzada al ser transportada a lo largo de los microtúbulos.

Este trabajo tuvo como objetivo evaluar la contribución de MLKL al establecimiento de la senescencia neuronal. Se observó que antes del establecimiento del fenotipo senescente en neuronas, se acumulan lisosomas con alteraciones morfológicas y acidez mayor a la óptima, que coinciden temporalmente con la fragmentación axonal de los microtúbulos, sugiriendo que la degeneración de los mismos detiene el transporte de los lisosomas. Se encontró a MLKL en la cercanía de los lisosomas por lo que proponemos que MLKL interactúa con proteínas involucradas en el equilibrio de pH lisosomal, alterando su morfología y función. En conjunto, estos cambios podrían impedir su fusión con autofagosomas y contribuir a la atrofia del flujo autofágico que lleva a la senescencia neuronal.

### 3 Lista de Abreviaturas

<b>BSA</b>	Albúmina de Suero Bovino
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidino-2-Fenilindol
<b>DIV</b>	Días In Vitro
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico (Del inglés Deoxyribonucleic Acid)
<b>LAMP1</b>	Proteína de Membrana Asociada a Lisosoma Tipo 1
<b>LAMP2</b>	Proteína de Membrana Asociada a Lisosoma Tipo 2
<b>LYNUS</b>	Sensor de Nutrientes Lisosomales
<b>MLKL</b>	Pseudocinasa con Dominio de Cinasa de Linaje Mixto (Del inglés Mixed Lineage Kinase Domain Like Pseudokinase)
<b>mTOR</b>	Blanco Mecánico de la Rapamicina
<b>Nec1</b>	Necrostatina 1
<b>PBS</b>	Amortiguador Fosfato Salino
<b>PLL</b>	Poli-L-Lisina
<b>RIPK1</b>	Cinasa 1 Serina/Treonina Interactuante con Receptor (Del Inglés Receptor Interacting Serine/Threonine Kinase 1)
<b>RIPK3</b>	Cinasa 3 Serina/Treonina Interactuante con Receptor (Del Inglés Receptor Interacting Serine/Threonine Kinase 3)
<b>ROS</b>	Especies Reactivas de Oxígeno
<b>SA-βgal</b>	Beta Galactosidasa Asociada a Senescencia
<b>SASP</b>	Fenotipo Secretor Asociado a Senescencia
<b>SNARE</b>	Receptor de La Proteína Unida al Factor Sensible a la N-etilmaleimida Soluble
<b>TFEB</b>	Factor de Transcripción EB (E Box)
<b>TMEM175</b>	Proteína Transmembranal 175
<b>TUJ1</b>	Beta III Tubulina
<b>γH2AX</b>	Histona X de la Familia H2A, Fosforilada en la S139

## 4 Introducción

### 4.1 Senescencia celular

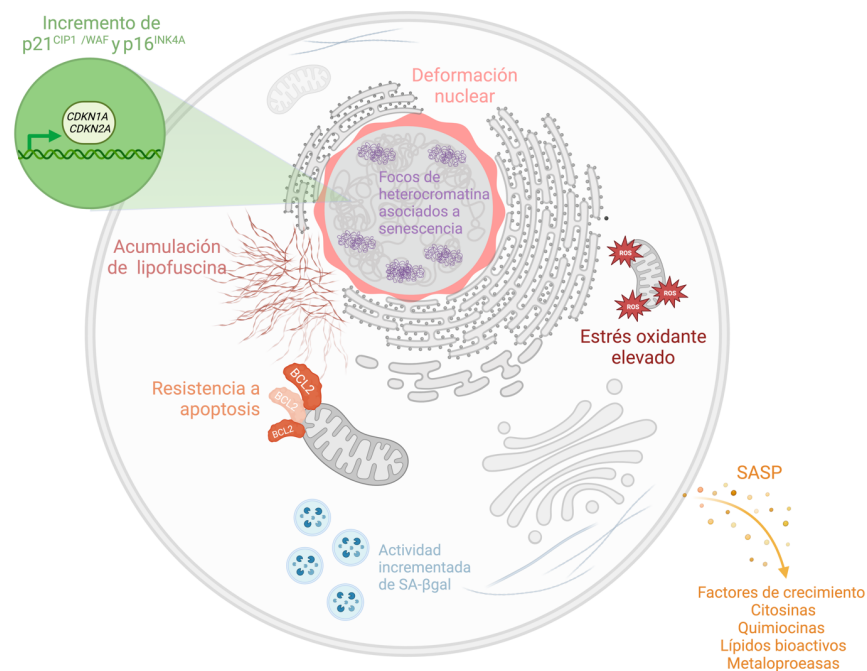
En 1965, Hayflick reportó que las células en cultivos primarios disminuyen su tasa de división a lo largo del tiempo y alcanzan un estadio en el cual detienen por completo su replicación, al cual denominó “senescencia celular” (Hayflick, 1965), conocida actualmente como senescencia replicativa. Hoy sabemos que todos los tipos celulares pueden adquirir un fenotipo senescente, incluso las células post-mitóticas como cardiomiocitos, osteocitos y neuronas (Sah et al., 2021; Sapienza & Mallette, 2018) ya que el arresto del ciclo celular no es la única característica de este fenotipo.

Las células senescentes presentan alteraciones en su morfología y metabolismo características (Figura 1). Estas incluyen un aumento en el daño oxidante, acumulación de lipofuscina, activación de la enzima lisosomal  $\beta$ -galactosidasa asociada a senescencia (SA- $\beta$ gal), una respuesta persistente al daño en el ADN que se detecta mediante focos de la histona  $\gamma$ H2AX, un aumento en la expresión de los genes *CDKN1A* y *CDKN2A*, que codifican los supresores tumorales p21<sup>CIP1/WAF</sup> y p16<sup>INK4A</sup> respectivamente y resistencia a la apoptosis conferida, por ejemplo, por un aumento en las proteínas antiapoptóticas de la familia BCL-2. Durante la senescencia celular, también se produce una deformación nuclear asociada a la degradación de proteínas de la lámina nuclear, lo que causa alteraciones en la estructura de la cromatina y, en consecuencia, en la expresión génica y la adquisición de un fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP, por sus siglas en inglés de Senescence Associated Secretory Phenotype) (Maciel-Barón et al., 2018; Ogrodnik et al., 2019).

El SASP incluye la secreción de citocinas, quimiocinas, lípidos bioactivos, factores de remodelación, proteasas de matriz extracelular, especies reactivas de oxígeno y nucleótidos no codificantes por parte de las células senescentes hacia el medio extracelular, el cual no es estático y puede cambiar respecto al tiempo, tipo celular y mecanismo de inducción de la senescencia (Chaib et al., 2022).

Las células senescentes tienen un papel fisiológico en distintas etapas de la vida de los organismos. Durante la embriogénesis estas células contribuyen al desarrollo del embrión y en la edad adulta, previenen la propagación de células dañadas y participan en la reparación tisular y supresión de tumores. Los factores contenidos en el SASP pueden modular la remodelación de tejidos, inducir respuestas inmunológicas durante infecciones o lesiones y favorecer la eliminación de células senescentes por parte del sistema inmune (Gorgoulis et al., 2019).

Normalmente estas células se eliminan en cuestión de días o semanas. Sin embargo, existe evidencia que indica que las células senescentes se pueden acumular y mediante el SASP promover la propagación paracrina y endocrina de la senescencia a un ritmo más rápido que el de eliminación a cargo de células del sistema inmune (Galluzzi et al., 2018). El aumento continuo de células senescentes contribuye al daño de tejidos y al desarrollo o progresión de múltiples enfermedades relacionadas al envejecimiento, así como al establecimiento de un ambiente inflamatorio sostenido que puede provocar disfunción de las células vecinas no senescentes (Chaib et al., 2022).



**Figura 1. Características de la célula senescente.**

Las células senescentes se caracterizan por el incremento de p21<sup>CIP1/WAF</sup> o p16<sup>INK4A</sup> que permite un arresto persistente del ciclo celular. Ocurren también incrementos en el daño oxidante y en la actividad de la enzima lisosomal β-galactosidasa. El aumento en proteínas de la familia BCL-2 les confiere resistencia a la apoptosis. A nivel nuclear se observan focos de heterocromatina asociados a senescencia y deformaciones en la envoltura nuclear. Aunado a estas características ocurre el establecimiento de un fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP). Imagen creada con BioRender

En el cerebro, las células senescentes (neuronales y gliales) pueden contribuir a la neuroinflamación y la pérdida de habilidades cognitivas asociadas al envejecimiento (Rachmian & Krizhanovsky, 2023). Las neuronas senescentes presentan las mismas características que las células mitóticas senescentes, incluyendo el incremento de los inhibidores del ciclo celular p21<sup>CIP1/WAF</sup> o p16<sup>INK4A</sup>, acumulación de lipofuscina, actividad incrementada de SA-βgal, deformaciones en la estructura nuclear y adquisición de un fenotipo secretor SASP (Gorostieta-Salas et al., 2021; Moreno-Blas et al., 2019).

#### 4.1.1 Vías de activación de la senescencia.

El daño al DNA es la causa de activación más frecuente del estadio senescente en las células. Cuando se daña el DNA se activa un conjunto de vías moleculares de manera coordinada, conocida como respuesta de daño al DNA (DDR, por sus siglas en inglés de *DNA Damage Response*), que modula el destino celular. Las proteínas adaptadoras MDC1 y 53BP1 son reclutadas a la región de DNA dañada junto con la forma activa de la cinasa mutada de ataxia telangiectasia (ATM) que fosforila a  $\gamma$ H2AX la cual puede utilizarse como marcador molecular de senescencia y a nivel molecular recluta ordenadamente las proteínas de respuesta a daño a DNA y a cinasas río abajo como el punto de control 1 (CHK1) y punto de control 2 (CHK2) que propagan la señal de daño a moléculas efectoras como SMC1, CDC25 y el supresor tumoral p53.

La senescencia celular también se induce por daño a los telómeros, ya que la pérdida de la estructura telomérica se detecta como DNA roto y se activa la DDR, de manera que también depende de p53 y está acompañada de un incremento en p21<sup>CIP1/WAF</sup>. Algunos tipos celulares también incrementan la producción de p16<sup>INK4A</sup>, lo cual genera un refuerzo en el arresto del ciclo celular para evitar el crecimiento de células con DNA dañado severamente o con telómeros disfuncionales. Las moléculas efectoras pueden inhibir el avance del ciclo celular transitoriamente mientras se repara el DNA, o permanentemente (senescencia), e incluso pueden inducir activación de programas de muerte celular (di Micco et al., 2021).

Experimentos en fibroblastos humanos, muestran que perturbaciones en la estructura de la cromatina generadas por inhibición farmacológica de las deacetilasas de histonas de clase I y clase II promueven la formación de eucromatina y esto a su vez la senescencia. El mecanismo de acción aún no se comprende en su totalidad, pero se sabe que esta inhibición induce la expresión de *CDKN1A* y *CDKN2A* (Campisi & D'Adda Di Fagagna, 2007).

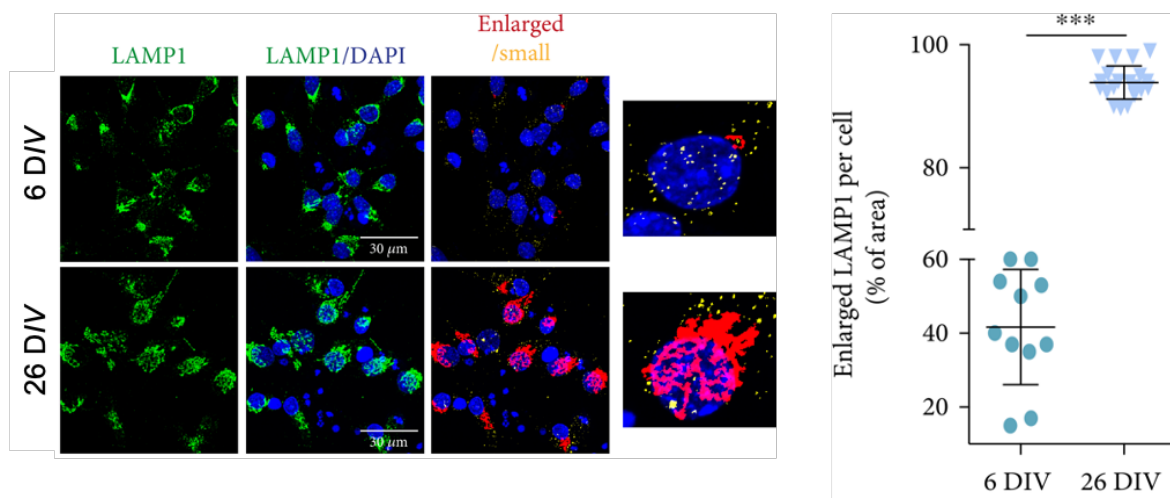
Otra manera en que las células pueden entrar a un estadio senescente es por la expresión de oncogenes como la forma oncogénica de *RAS* o *E2F.1*, que promueven la proliferación celular. La senescencia celular puede ser una respuesta para prevenir la transformación en células tumorales ante un estímulo miogénico excesivo. Esta vía se identificó en experimentos *in vitro* inicialmente e *in vivo* se ha observado en células dérmicas humanas provenientes de tumores benignos cuando ocurre activación de oncogenes como *BRAF* o pérdida de la proteína supresora de tumores (PTEN) (Campisi & D'Adda Di Fagagna, 2007).

La señalización prolongada inducida por citocinas anti-proliferativas como el interferón  $\beta$  también tiene el potencial de inducir senescencia al inhibir reversiblemente el avance del ciclo celular pero cuando esta estimulación es crónica, se incrementan la cantidad de especies reactivas de oxígeno que a su vez pueden generar una respuesta de DDR dependiente de p53 (Moiseeva et al., 2006).

En resumen, el fenotipo senescente es establecido y mantenido por las vías de p21<sup>CIP1/WAF</sup>, p16<sup>INK4A</sup> y p53, las cuales pueden activarse simultáneamente o actuar independientemente de acuerdo al estímulo inicial que se presenta a la célula.

En el caso particular de las neuronas, también el daño al DNA induce senescencia (Jurk et al., 2012). Sin embargo, durante el envejecimiento la senescencia neuronal se induce cuando falla la autofagia (Moreno-Blas et al., 2019; Gorostieta-Salas et al., 2021), que es un proceso catabólico que permite reciclar componentes celulares al degradarlos empleando enzimas lisosomales y se describe más adelante.

Algunos de los lisosomas de neuronas senescentes se encuentran agrandados como se observa en la figura 2 (Gorostieta-Salas et al., 2021), por lo que es posible que cambios en la estructura y función de los lisosomas sean un desencadenante de la senescencia neuronal, al provocar fallas en la autofagia.

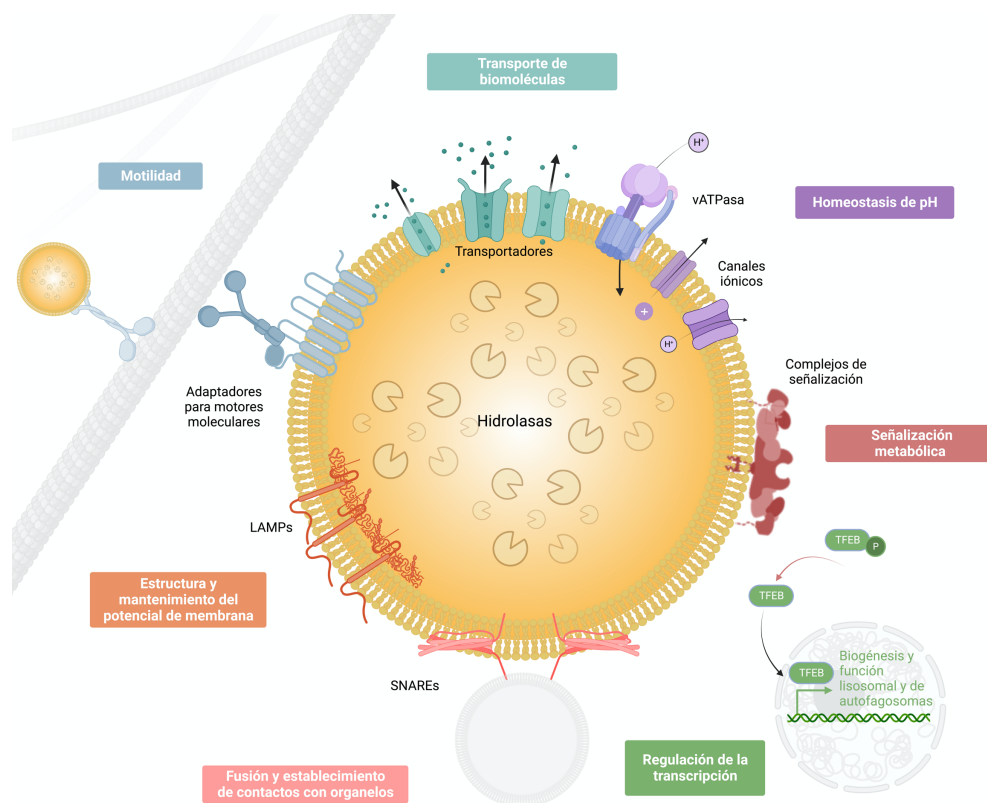


**Figura 2. En las neuronas senescentes incrementa el número de lisosomas y algunos presentan morfología alterada.**

Inmunofluorescencia para detectar LAMP1, proteína de membrana lisosomal, en cultivo primario de neuronas corticales de rata con 6 y 26 días *in vitro*. En rojo se muestran los lisosomas agrandados por célula, en amarillo, los lisosomas pequeños por célula. La gráfica corresponde a la abundancia de LAMP1 por célula, únicamente se cuantificaron células con núcleos sanos. (Gorostieta-Salas et al., 2021)

## 4.2 Función y morfología lisosomal

La mayoría de los estudios estructurales de los lisosomas se han hecho con microscopía electrónica, que ha permitido determinar la ultraestructura del organelo (de Araujo et al., 2020). Son organelos con una membrana lipídica que contiene proteínas que permiten su participación en distintas funciones, como el transporte de iones y biomoléculas, la fusión con otras estructuras celulares y señalización metabólica, por ejemplo en respuesta al ayuno al reclutar a mTOR en su membrana, entre otras (Figura 3).



**Figura 3. Funciones del lisosoma**

El lisosoma contiene una amplia diversidad de proteínas que le permiten llevar a cabo distintas funciones dentro de la célula. El lumen lisosomal contiene hidrolasas ácidas que degradan diferentes sustratos, activadores enzimáticos y factores protectores que ayudan en la degradación, así como factores de transporte que permiten la exportación de biomoléculas y otros productos de degradación lisosomal. El pH ácido del lumen lisosomal se mantiene con la ATPasa vacuolar (v-ATPasa), canales iónicos y transportadores moleculares. Además, la membrana lisosomal contiene proteínas altamente glicosiladas llamadas LAMPs que protegen la membrana lisosomal de la degradación al amortiguar el pH y participan en el mantenimiento del potencial de membrana. En la membrana lisosomal se encuentran también las proteínas SNAREs que median la fusión de lisosomas con otros organelos. Los lisosomas sirven como plataforma para la asociación de complejos proteicos señalizadores, como mTORC1 que a su vez regulan la biogénesis lisosomal, la autofagia y el metabolismo energético. Tienen en su membrana adaptadores para motores moleculares que permiten que los lisosomas sean transportados a través de los microtúbulos para alcanzar distintos destinos celulares. Imagen creada con BioRender.

Para dar estructura a la membrana lisosomal, existen también proteínas estructurales como la proteína 1 asociada a lisosomas (LAMP1) que es una glicoproteína que representa aproximadamente el 50% de la proteína total en la membrana lisosomal (Settembre et al., 2013) y cuya presencia permite formar el glicocálix dentro del lisosoma que amortigua el pH del lumen lisosomal y participa en el establecimiento del potencial de membrana (Eskelinen et al., 2003).

El pH dentro del lisosoma es regulado por la ATPasa tipo V, que introduce protones en sentido contrario al gradiente electroquímico. Durante su maduración, el pH de los lisosomas disminuye gradualmente, lo cual es crucial para poder integrar las hidrolasas a su interior y permitir su maduración. Típicamente los lisosomas son esféricos, con extensiones tubulares temporales cuando se están reciclando (Mindell, 2012) y se ha establecido que los lisosomas de tamaño anormal no participan adecuadamente en la exocitosis (Bandyopadhyay et al., 2014). La acidificación lisosomal podría estar afectada por la posición intracelular donde se encuentra cada uno de los lisosomas, ya que esto determinaría los materiales biosintéticos a los que tendría acceso, siendo las proteínas de membrana lisosomal Rab7 y Arl8b las responsables de la localización subcelular de los lisosomas (Johnson et al., 2016). Dentro del lisosoma se pueden encontrar aproximadamente 60 hidrolasas distintas que se activan a un pH promedio de 4.6. Estas hidrolasas pueden ser sulfatasas, proteasas, glicosidasas, fosfatasas, lipasas y nucleasas que en conjunto permiten que el lisosoma degrade una gran cantidad de sustratos (Trivedi et al., 2020).

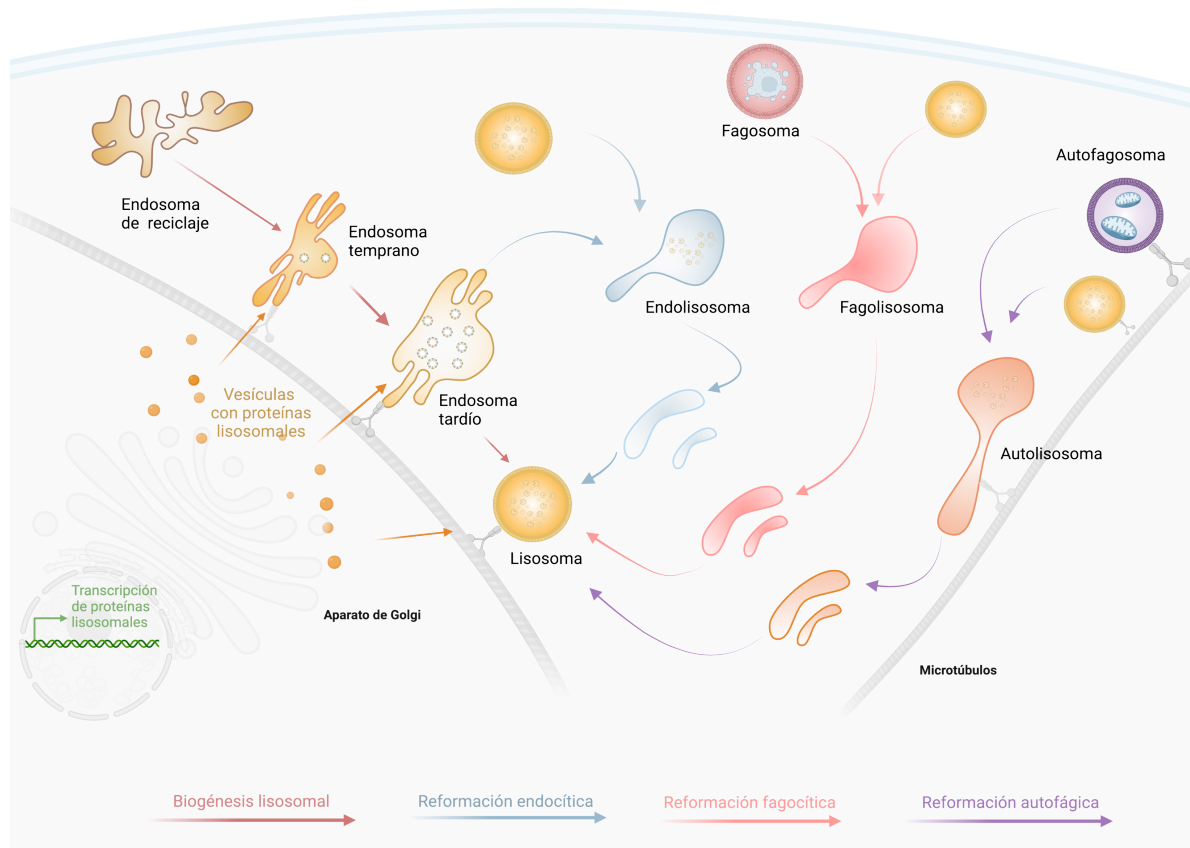
Los lisosomas participan en procesos de degradación, secreción y señalización. En el caso de la degradación, se requiere que los componentes celulares a degradar lleguen al interior de los lisosomas, lo cual se logra con procesos como la autofagia. Los lisosomas a su vez, pueden secretar su contenido en un proceso conocido como exocitosis lisosomal que se caracteriza por la traslocación de proteínas de membrana lisosomal a la membrana plasmática. Este mecanismo es regulado por  $Ca^{2+}$  e induce la liberación del contenido lisosomal a la matriz extracelular (Settembre et al., 2013).

Sobre la superficie lisosomal se puede localizar mTOR, lo cual sugiere que estos organelos participan en el monitoreo intracelular de nutrientes. Al ensamblarse mTORC1 en conjunto con otras proteínas lisosomales recibe el nombre de LYNUS (sensor de nutrientes lisosomales) y permite responder al contenido de aminoácidos en el interior de los lisosomas y señala hacia el citoplasma y el núcleo. Cuando hay falta de nutrientes, el complejo mTORC1 se libera de la maquinaria de LYNUS y se inactiva (Mony et al., 2016). La falta de nutrientes o el estrés lisosomal inhiben a mTORC1 y permiten que el factor de transcripción EB (TFEB) sea desfosforilado por la proteína fosfatasa 2A (PP2A). La forma desfosforilada de TFEB puede ser importada al núcleo, favoreciendo la expresión de genes codificantes para hidrolasas y proteínas de la membrana lisosomal (Settembre et al., 2012).



#### 4.2.1 Biogénesis, maduración y reformación lisosomal

Dadas sus variadas funciones dentro de la célula, los lisosomas deben adaptarse a estímulos intracelulares y extracelulares. La biogénesis lisosomal es uno de los mecanismos que estos organelos emplean para responder a los estímulos celulares en conjunto con los mecanismos de reformación lisosomal que puede darse por tres vías, endocítica, autofágica y fagocítica (Yang & Wang, 2021) como se esquematiza en la figura 4.



**Figura 4. Biogénesis, maduración y reformación lisosomal.**

Las proteínas lisosomales recién sintetizadas se transportan a través del aparato de Golgi, donde pueden ingresar endosomas tempranos, tardíos o lisosomas maduros (flechas naranjas). La conversión de los endosomas tempranos a endosomas tardíos se lleva a cabo mientras se desplazan hacia el espacio perinuclear a lo largo de los microtúbulos y continúan experimentando un proceso de maduración hasta convertirse en lisosomas funcionales (flechas rojas). Para ejercer su función de degradación, los lisosomas pueden fusionarse con endosomas (flechas azules), fagosomas (flechas rosas) o autofagosomas (flechas moradas), lo cual genera un organelo híbrido transitorio en el que se produce la degradación del contenido a reciclar conocido como endolisosoma, fagolisosoma o autolisosoma respectivamente. Los lisosomas se pueden reformar a partir de estas estructuras por tubulación y escisión para formar protolisosomas, que pueden madurar como lisosomas funcionales. Imagen creada con BioRender.

La mayoría de las enzimas lisosomales antes de llegar al lumen lisosomal, son sintetizadas y modificadas en el aparato de Golgi, donde se les añade una manosa-6-fosfato que les permite ser secretadas en vesículas con clatrina y posteriormente captadas por el lisosoma empleando el receptor de manosa-6-fosfato, presente en su membrana (Settembre et al., 2013).

En el caso de la vía endocítica, se requiere un gradiente de protones y de  $\text{Ca}^{2+}$ , ya que es dependiente del canal de calcio TRPML1 y PIKfyve presentes en la membrana lisosomal. PIKfyve cataliza la conversión del PtdIns3P en PtdIns (3,5) P2 provocando la activación de TRPML1 y la tubulación y escisión de los lisosomas para reciclar sus membranas (Dong et al., 2010).

La recuperación de lisosomas ocurre también a partir de autolisosomas (se describen más abajo). La membrana de origen lisosomal en el autolisosoma genera túbulos lisosomales guiados por clatrina y KIF5B. Una vez que los túbulos se forman, la proteína DNM2 (dinamina 2) escinde el túbulo formando protolisosomas sin contenido lisosomal y pH neutro que posteriormente pueden madurar al adquirir las proteínas lisosomales (Chen & Yu, 2017).

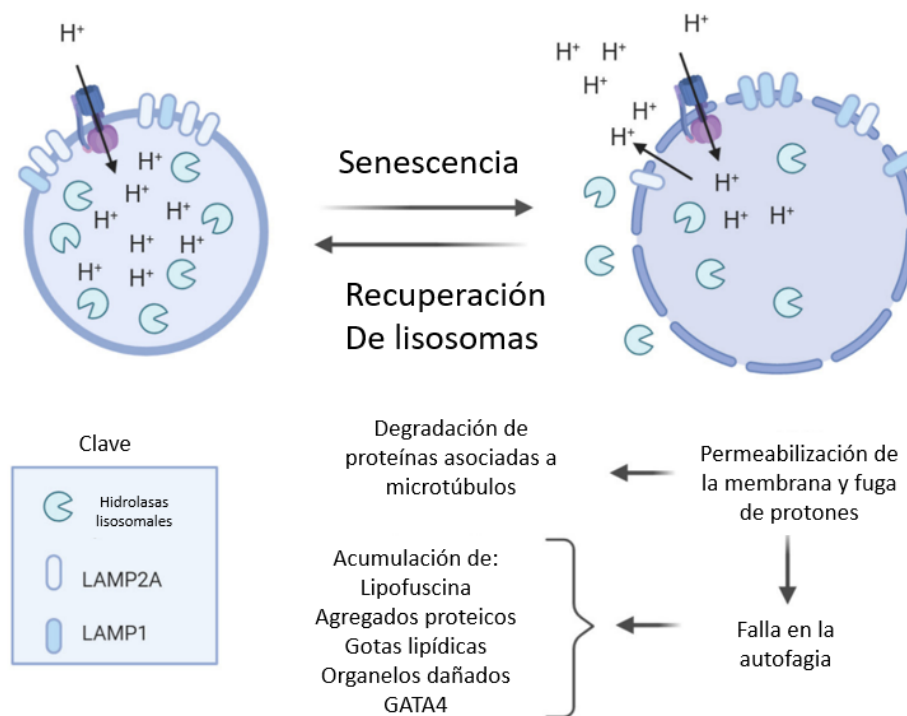
La vía (hetero)fagocítica ocurre cuando se forma un fagolisosoma como consecuencia de fagocitar células vivas o muertas. Este proceso es similar a la vía endocítica y requiere igualmente TRPML1, PIKfyve para su ejecución (Bouhamdani et al., 2021).

#### 4.2.2 Cambios en la estructura y función lisosomal durante el envejecimiento

En cerebros de ratas adultas se ha encontrado actividad de la proteína lisosomal catepsina D, cuya localización en citoplasma sugiere que existe permeabilización de la membrana lisosomal (Nakamura et al., 1989). La permeabilización tiene como efecto la disfunción de la autofagia al perder estabilidad la membrana lisosomal impidiendo la fusión del autofagosoma con el lisosoma y la liberación del contenido lisosomal al citosol. Aunado a ello, se ha observado que los lisosomas se alargan en neuronas envejecidas, lo cual los hace más propensos a que su membrana se permee, este alargamiento podría estar asociado con la disminución de proteínas estructurales como LAMP1, sin embargo, no se ha descartado que existan otras proteínas asociadas a este proceso.

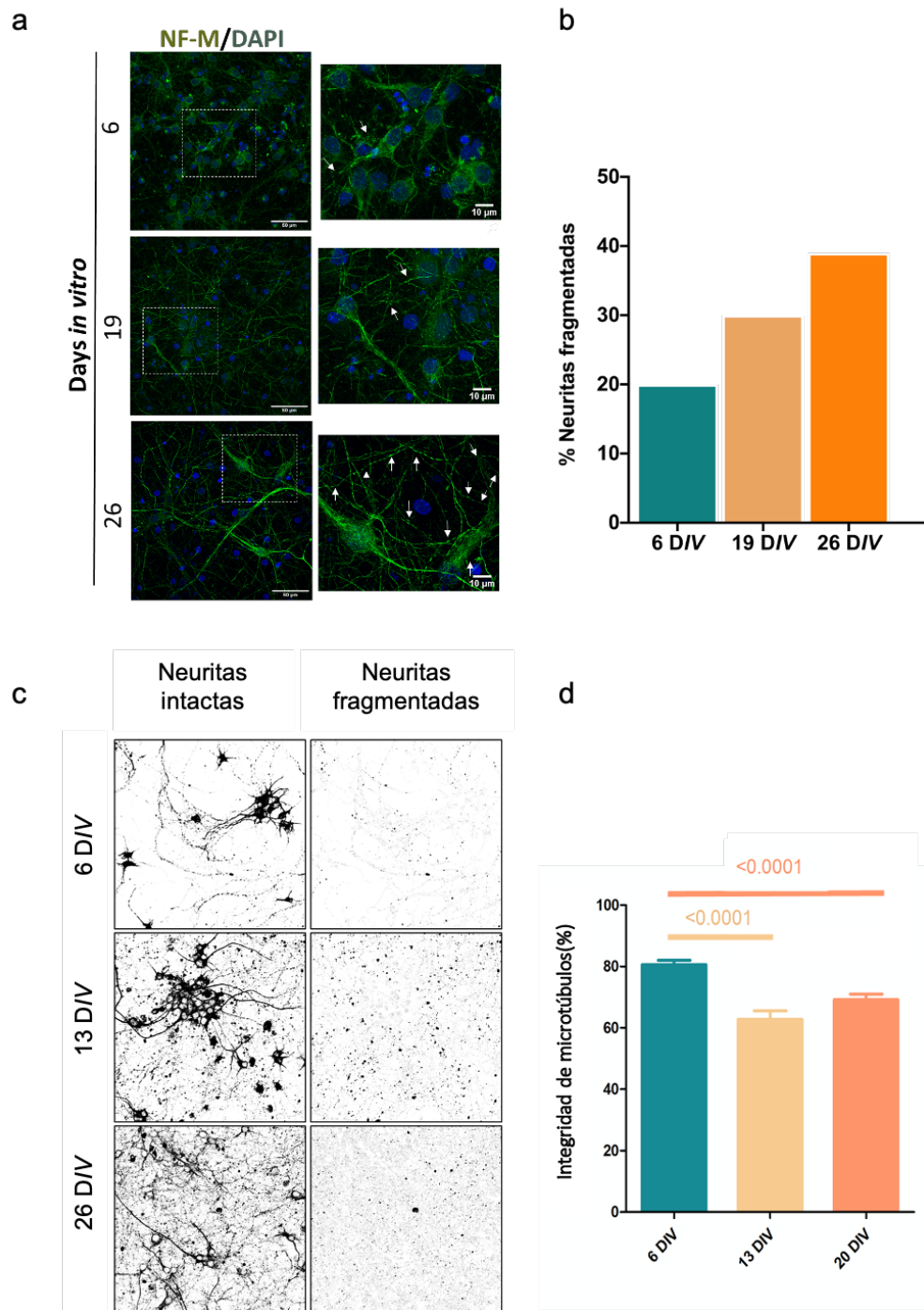
Los lisosomas de células envejecidas se caracterizan también por un incremento en su pH al darse una fuga de protones constante, lo cual afecta la actividad enzimática de las proteínas contenidas en él (Figura 5). Como consecuencia de lo anterior los lisosomas acumulan el material a degradar, por ejemplo, la lipofusina, la cual afecta la función lisosomal y la integridad de su membrana, causando permeabilización de la misma (Sikora et al., 2021).

Un ejemplo de la disfunción lisosomal y su papel en la neurodegeneración es el caso de presenilina 1, que participa en la localización de la subunidad  $V_0a1$  de la V-ATPasa lisosomal. Cuando esta proteína no puede ejercer su función, los lisosomas no pueden acidificarse y falla la degradación de los cargos del autofagosoma, este efecto se observa en el caso de la enfermedad de Alzheimer (Lee et al., 2010). Estos hallazgos sugieren que los cambios dependientes de la edad en los lisosomas afectan la autofagia y podrían ocurrir también durante la senescencia celular (Sikora et al., 2021).



**Figura 5. Alteraciones lisosomales asociadas al envejecimiento.**

Modificada de (Sikora et al., 2021). El envejecimiento puede causar cambios en los lisosomas como incremento en su tamaño y cambios en su contenido de proteína. Concretamente, el nivel de LAMP1 aumenta mientras que el de LAMP2A disminuye. Ocurre también permeabilización de la membrana lisosomal, lo que resulta en la fuga de protones e hidrolasas lisosomales hacia el citosol. La hidrólisis incontrolada de proteínas, como la de las proteínas asociadas a los microtúbulos, puede afectar su función y provocar la muerte celular. La fuga de protones impide el mantenimiento de un pH lisosomal bajo, como resultado se da un declive en la función lisosomal que puede afectar la función celular y provocar la acumulación de proteínas agregadas, lipofuscina y organelos dañados.



**Figura 6. La integridad de los neurofilamentos y microtúbulos disminuye antes del establecimiento de la senescencia neuronal.**

a) Imágenes confocales de inmunofluorescencia para detectar el polipéptido medio de neurofilamentos (NF-M) en cultivos primarios de neuronas corticales con 6, 19 y 26 días *in vitro*. b) Previo al establecimiento del fenotipo senescente disminuye la integridad de los neurofilamentos. Datos no publicados de Daniel Moreno-Blas. c) Imágenes confocales de inmunofluorescencia para detectar  $\beta$ III-Tubulina binarizadas usando software FIJI para determinar el porcentaje de integridad de microtúbulos en cultivos primarios de neuronas corticales con 6, 13 y 26 días *in vitro*. Datos provenientes de un solo experimento d) Media del porcentaje de integridad de los microtúbulos. Los datos de 3 experimentos independientes fueron analizados por ANOVA unidireccional seguido de la prueba de Bonferroni, los números indican los valores de p. Datos no publicados de Gisselle A. Campos-Martínez.

Como se mencionó antes, en las neuronas senescentes se observan lisosomas con morfologías aberrantes (Figura 2). En trabajo previo de nuestro grupo de investigación se observó que la integridad de los microtúbulos (Figura 6 c,d) y neurofilamentos (Figura 6 a,b) disminuye durante la adquisición del fenotipo senescente (geroconversión). Es posible entonces que en las células neuronales senescentes el movimiento de los lisosomas dentro de las células esté impedido y provoque su acumulación, modificando su morfología y causando alteraciones en la autofagia y como consecuencia el establecimiento de la senescencia neuronal.

### 4.3 Autofagia

Las células tienen mecanismos para mantener su homeostasis y prevenir el daño, uno de estos mecanismos es la autofagia que es un proceso celular catabólico necesario para mantener el balance energético en momentos críticos de crecimiento celular y/o estrés. También participa contrarrestando el daño celular, removiendo las proteínas mal plegadas o agregadas y eliminando organelos dañados como la mitocondria, el retículo endoplásmico, los peroxisomas, etc. (Galluzzi et al., 2017). Es necesaria para el desarrollo embrionario y diversos procesos fisiológicos, como la transmisión sináptica (Lieberman & Sulzer, 2020; Mizushima & Levine, 2010). Es un sistema conservado evolutivamente que dirige los blancos dañados, proteínas, u organelos, hacia el interior de la vacuola en hongos o lisosoma en el caso de mamíferos, para su degradación.

En la regulación de la autofagia participan diversas vías de señalización, que generalmente se dividen como dependientes de mTOR e independientes de mTOR. mTOR es una serin treonin cinasa altamente conservada que participa en la regulación de la autofagia y en el control de la transcripción de genes codificantes para la dinámica de los microtúbulos. Participa también en el crecimiento y proliferación de las células, así como en el metabolismo de glucosa. Integra señales intracelulares y factores de crecimiento para mantener un balance entre la biosíntesis de proteínas y el crecimiento celular. También funciona como sensor de moléculas energéticas como el ATP. Aunque mTOR se considera el principal regulador de la autofagia, este proceso puede ser regulado también por las vías de  $Ca^{2+}$ /calpaína, cAMP/EPAC/PLC, y JNK1/BECN1/PI3K-III (Pierzynowska et al., 2018).

La autofagia puede dividirse en tres tipos principales: microautofagia, macroautofagia y autofagia mediada por chaperonas. El estudio de los diferentes tipos de autofagia ha adquirido importancia en los últimos años porque alteraciones en su función tienen un papel central en el envejecimiento y la aparición de enfermedades como cáncer, diabetes, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer entre otras (Rubinsztein et al., 2011). El sistema nervioso de los mamíferos requiere autofagia para mantener la homeostasis neuronal. Experimentalmente, se ha probado la importancia fisiológica de la autofagia en la

salud neuronal, que se refiere a que las neuronas pueden existir en un equilibrio dinámico manteniendo su integridad estructural y fisiológica (Isacson, 1993). Aunque se trate de sistemas conservados, no todos los organismos o tipos celulares tienen la capacidad de realizar los tres tipos de autofagia (Hansen et al., 2018). En levaduras y plantas puede ocurrir *microautofagia*, proceso por el cual los blancos se invaginan directamente en la membrana de la vacuola.

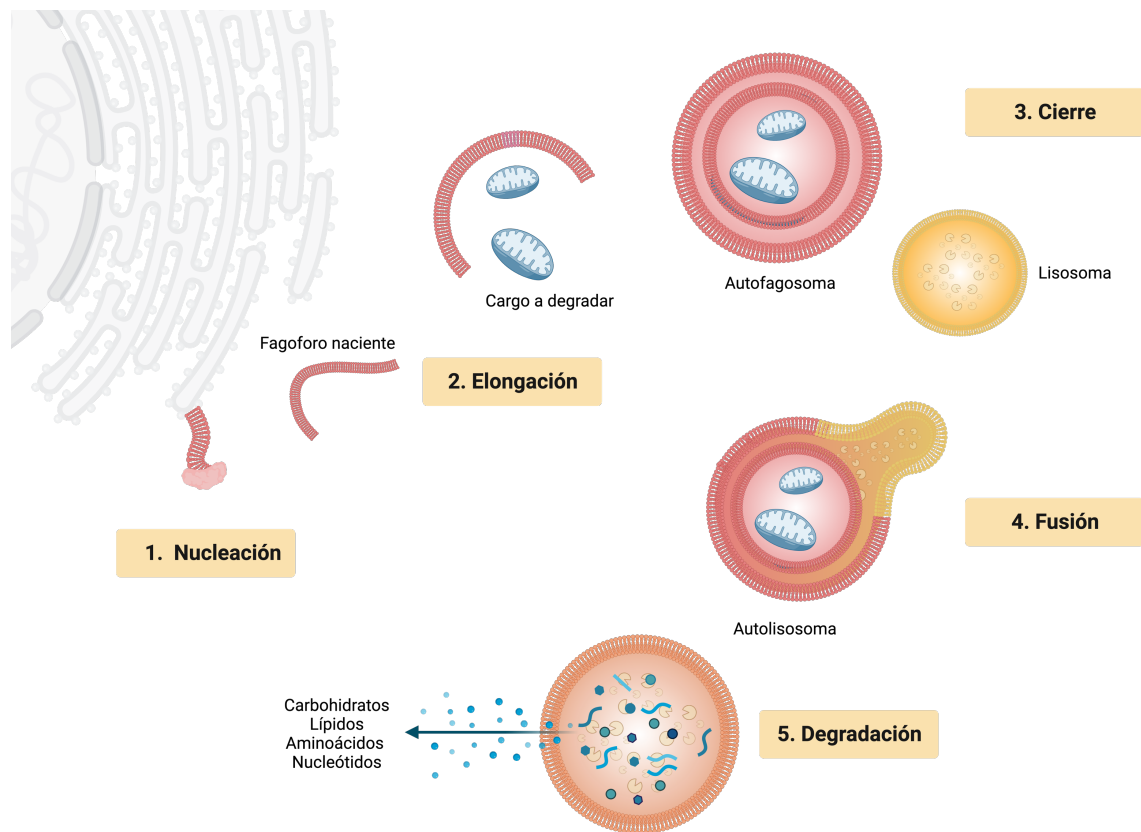
El proceso de *autofagia mediada por chaperonas* permite que proteínas citosólicas marcadas para degradación ingresen al lisosoma sin necesidad de vesículas o invaginación de membrana, utilizando un complejo de traslocación de proteínas en la membrana lisosomal que reconoce al motivo KFERQ en la estructura de las proteínas a degradar (Cuervo et al., 2014).

La *macroautofagia* a su vez, requiere la formación de una membrana alrededor de las moléculas u organelos a degradar, el mecanismo detallado se describe a continuación, ya que este tipo de autofagia es el que se ha visto mayoritariamente involucrado con el establecimiento del estadio senescente (Feng et al., 2014). La macroautofagia puede ser selectiva o no, la naturaleza de los cargos a degradar determina los tipos de receptores que serán reconocidos durante la iniciación del proceso (Galluzzi et al., 2017).

#### 4.3.1 Macroautofagia

Durante la macroautofagia se pueden distinguir 5 etapas principales que se ilustran en la figura 7 (Galluzzi et al., 2017b; Hansen et al., 2018). El proceso incluye la formación de un fagóforo que es una membrana de aislamiento, la elongación y cierre del fagóforo seguida por la fusión con el lisosoma y la degradación de los cargos, que luego pueden ser reciclados para producir energía o sintetizar nuevos componentes celulares (Feng et al., 2014). En algunos casos, los componentes pueden ser secretados, como ocurre con virus o bacterias (Ponpuak et al., 2015), o proteínas (forma no convencional de secreción de proteínas) (Gonzalez et al., 2020).

La iniciación es mediada por la cinasa ULK1 que al ser fosforilada en distintos aminoácidos por mTOR o AMPK puede ser inhibida o activada respectivamente. ULK1 se une al complejo 1 de la cinasa clase III de posfatidilinositol-3 (PI3KC3) para producir fosfatidilinositol 3 fosfato (PI3P) y reclutar al sitio de ensamblaje del fagoforo (nucleación) proteínas efectoras que permiten la elongación del fagoforo (WIPI2, DFCP1, ATG2). Los lípidos empleados en la elongación provienen de varias fuentes, incluyendo el retículo endoplásmico, la membrana plasmática, las mitocondrias, endosomas y el aparato de Golgi mediante ATG9, que funciona como escramblasa (Kitada & Koya, 2021; Schütter et al., 2020).



**Figura 7. Etapas de la macroautofagia.**

La macroautofagia comienza con la formación de un fagoforo o membrana de aislamiento en el retículo endoplasmático (RE). Los fagoforos se elongan y se cierran una vez que el cargo es reconocido y rodeado formando estructuras que se conocen como autofagosomas. Los autofagosomas se fusionan con lisosomas para formar autolisosomas. Esto promueve el contacto de los cargos a degradar con las hidrolasas lisosomales. Los productos de estas reacciones catabólicas llegan al citosol a través de transportadores de la membrana lisosomal y son reciclados por vías anabólicas de la célula. Imagen creada con BioRender.

Las proteínas de las familias LC3 y GABARAP pueden procesarse proteolíticamente y lipidarse para unirse a las membranas del autofagosoma donde participan en el reconocimiento del cargo y permiten el reclutamiento al fagoforo al interactuar con receptores de autofagia o receptores unidos a los organelos a degradar. La proteína LC3 es escindida por la proteasa ATG4 para formar LC3-I de manera constitutiva. Cuando se induce la autofagia LC3-I se conjuga con la fosfatidiletanolamina presente en el fagoforo naciente, reacción catalizada por ATG7 y ATG3 para formar LC3-II. El complejo ATG12-ATG5/ATG16L promueve que se forme LC3-II y su unión al fagoforo para que pueda interactuar con los receptores de autofagia que reconocieron el cargo y guíe la elongación del fagoforo alrededor del cargo. Una vez formado el autofagosoma, LC3-II se remueve de la superficie externa de los autofagosomas por acción nuevamente de la proteína ATG4, para permitir la fusión del autofagosoma con el lisosoma (Kitada & Koya, 2021).

Para la fusión del autofagosoma con el lisosoma se emplea a la proteína UVRAG, la interacción de UVRAG con la proteína HOPS estimula la fusión del autofagosoma con el lisosoma. Aunado a HOPS, la fusión requiere a la proteína sintaxina 17 (STX17) que facilita la fusión de las membranas, GTPasas pequeñas como Rab-7a y proteínas SNARE que funcionan como anclaje entre ambas estructuras (Hansen et al., 2018). Cuando el cargo es degradado y liberado al citoplasma los lisosomas pueden regenerarse a partir de la membrana del autolisosoma en un proceso conocido como reformación autofágica de lisosomas antes descrito. Este paso es necesario para mantener una tasa funcional de lisosomas que puedan volver a emplearse en autofagia si fuera necesario para la célula (Zhao et al., 2021).

En diversas especies hay una reducción en la proteólisis lisosomal en organismos viejos comparada con organismos jóvenes, indicando que falla la autofagia. Dado que la autofagia tiene influencia en múltiples procesos fisiológicos, como son el mantenimiento energético, del genoma y de la troncalidad; la respuesta celular a estrés; defensa contra patógenos; etc., el que falle la autofagia contribuye a los cambios en el organismo que definen el envejecimiento. Aunque el mecanismo por el cual la autofagia previene el envejecimiento no se ha esclarecido del todo, diversas intervenciones genéticas o farmacológicas que estimulan la autofagia tienen un efecto que extiende la longevidad y confieren geroprotección (Kaushik et al., 2019).

#### 4.3.2 Macroautofagia en neuronas

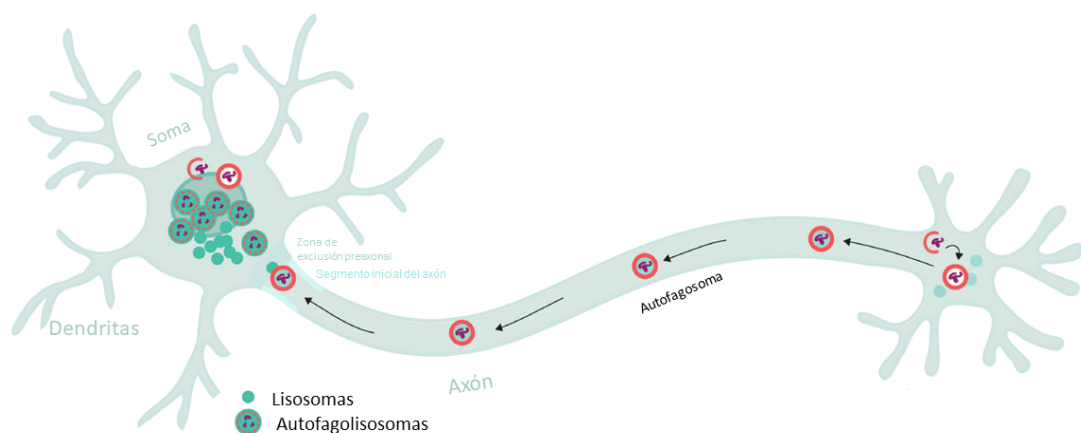
En la morfología neuronal se puede distinguir el soma, las dendritas, la zona de exclusión preaxonal, el segmento inicial del axón, el axón y la región terminal del mismo (Nirschl et al., 2017). Esta elaborada morfología presenta un reto para llevar a cabo la autofagia en neuronas, ya que implica trasladar los autofagosomas desde la región terminal del axón, donde se concentran las actividades biosintéticas, al soma, donde existe una mayor cantidad de lisosomas (Figura 8) (Kulkarni et al., 2018).

En el axón, los autofagosomas se desplazan en sentido retrogrado hacia el soma empleando el sistema de transporte dineína/dinactina (Sleigh et al., 2019). Los autofagosomas se originan predominantemente en el extremo distal del axón. La existencia de regiones de ensamblaje de autofagosomas en las neuronas, sugiere que podría haber regiones celulares que favorecen la biogénesis de autofagosomas cerca de las puntas axonales crecientes de las terminales sinápticas. La proteína Basson controla la autofagia presináptica al secuestrar a ATG5, previniendo la síntesis de autofagosomas (Reimer et al., 2017). En ratones con un silenciamiento condicional de *Atg5* se probó que la ausencia de autofagia genera una acumulación de retículo endoplásmico tubular en los axones que incrementa la neurotransmisión excitatoria y compromete la viabilidad postnatal (Kuijpers et al., 2021).



La maduración de autofagolisosomas se caracteriza por un incremento en la acidificación de su interior y contenido de catepsina como consecuencia de la fusión con el lisosoma para formar los autolisosomas. La inhibición experimental del motor de dineína genera la acumulación de vesículas autofágicas y prelisosomas en los axones distales, posiblemente como consecuencia de la alteración de la fusión autofagosoma-lisosoma. Estos resultados sugieren que se requiere del transporte axonal para la maduración de los autofagolisosomas que involucra a proteínas motoras, la ATPasa lisosomal y procesos de fusión de membrana. Sin embargo, la comprensión de la relación molecular existente entre ellos es baja (Kuijpers et al., 2021).

Una vez en el soma, los autolisosomas se acumulan en las regiones somato dendríticas para evitar que entren de nuevo al axón, proceso en el cual podrían participar mecanismos de organización celular de la zona de exclusión preaxonal (Maday et al., 2012). Es la compartimentalización, lo que se piensa que facilita la maduración al promover la fusión con lisosomas concentrados en el soma para asegurar el reciclamiento eficiente de las biomoléculas y su distribución hacia regiones celulares especializadas en biosíntesis (Kulkarni et al., 2018). Sin embargo, aún es necesario entender las vías espacio-temporales de autofagia en condiciones como la senescencia neuronal.



**Figura 8. Representación de la distribución espacial de la autofagia en neuronas**

(modificado de Kulkarni et al., 2018). Los autofagosomas axonales se originan en la zona distal del axón y se transportan hacia el soma. Los autofagosomas se fusionan con los lisosomas en el segmento inicial del axón generándose así los autofagolisosomas que llevarán a cabo su función degradativa en el soma de las neuronas.

La autofagia es esencial para la función neuronal. Experimentos con modelos animales que presentan deficiencia de autofagia permitieron determinar el rol crítico que tiene este proceso en la homeostasis neuronal y neurogénesis. Los ratones en los cuales se abatió la expresión de genes *Atg*, desarrollaron neurodegeneración temprana

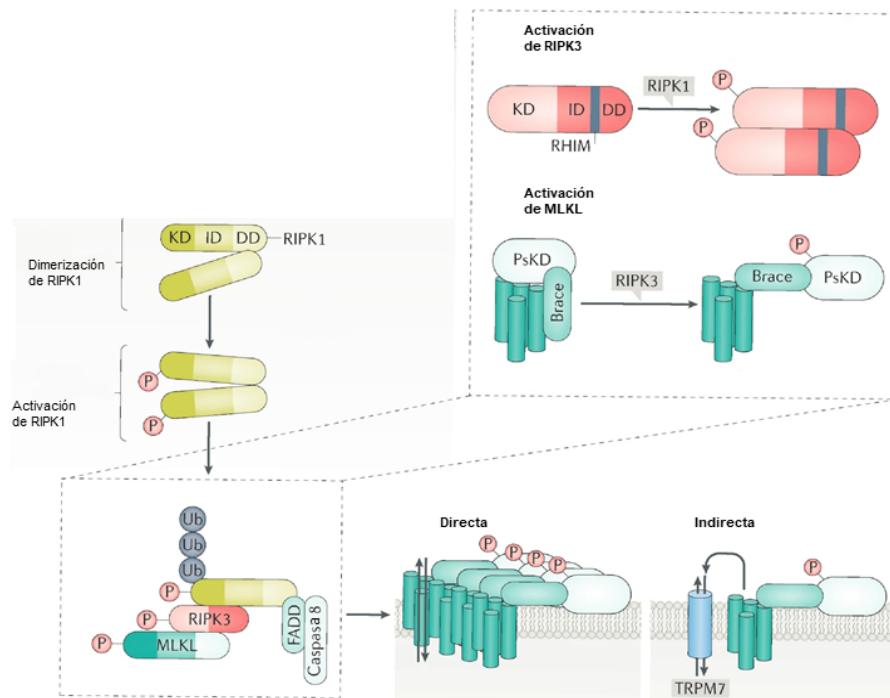
caracterizada por la acumulación de proteínas ubiquitinadas y aparición de inclusiones en las neuronas. En ratones deficientes de autofagia neuronal (*Tsc2<sup>+/-</sup>:Atg7<sup>-/-</sup>*) se reportó que la autofagia neuronal permite la poda de sinapsis durante el desarrollo de las espinas dendríticas y que la activación de autofagia neuronal podría ser empleada para corregir patologías asociadas a la formación de sinapsis, como desordenes del espectro autista (Tang et al., 2014). Mutaciones en el gen *WD*, asociado a autofagia se han identificado como la causa de la microcefalia dominante autosomal en humanos (Narita et al., 2011).

Además de su papel en la neurogénesis embrionaria, se piensa que la autofagia participa en la diferenciación de células troncales neurales. Estas células se encuentran en nichos en el ventrículo lateral y el giro dentado. Experimentos *in vitro* permitieron determinar que el flujo autofágico es bajo, previo a la diferenciación e incrementa durante la diferenciación temprana. Actualmente se estudia el rol potencial de la autofagia en la plasticidad neuronal, consolidación de memorias, comportamiento adaptativo y reparación de daño cerebral. Se sugiere que la autofagia tiene un papel crucial en el crecimiento axonal, ensamble de sinapsis y formación de espinas dendríticas (Fleming & Rubinsztein, 2020).

Aunque la formación del autofagosoma principalmente se ha estudiado en el extremo distal del axón y en el soma, existen reportes que demuestran que se pueden formar autofagosomas en dendritas, en respuesta a estímulos particulares como inhibición de los receptores de NMDA, que a su vez inhiben la vía mTOR empleando la cascada de señalización PI3K-AKT (Shehata et al., 2012). Las neuronas también forman autofagosomas en el soma que pueden mantenerse por largos periodos de tiempo y se caracterizan por acumular lipofuscina y neuromelanina. Estos pigmentos provienen de la degradación incompleta de proteínas y lípidos principalmente derivados de la degradación mitocondrial o productos de catecolaminas oxidadas. Estas vesículas autofágicas pueden acumularse a lo largo de la vida de las neuronas y llegar a ocupar una porción amplia del soma, ya que estos pigmentos pueden ser resistentes a la degradación lisosomal y/o fusión inadecuada con los lisosomas. Esta acumulación puede interferir con otras vías de degradación o secretoras (Sulzer et al., 2008).

Como se mencionó anteriormente, resultados de nuestro grupo muestran que la integridad de los microtúbulos se pierde durante la geroconversión en cultivos primarios de neuronas corticales a largo plazo. Revisando en la literatura qué señal podría disparar la fragmentación de los microtúbulos, encontramos que durante la degeneración axonal generada por axotomía (degeneración Walleriana) la vía de señalización RIPK1-RIPK3-MLKL promueve la fragmentación axonal. De hecho, el inhibir genética o farmacológicamente la vía de señalización RIPK1-RIPK3-MLKL revierte la degeneración axonal (Arrázola et al., 2019; Arrázola et al., 2023). Y resulta interesante que en ratones viejos, se activa esta vía en el cerebro y se observan menos células senescentes en cerebros de ratones viejos con una mutación nula en el gen *Mkl1* (Arrázola et al., 2023).

#### 4.4 Vía de señalización RIPK1-RIPK3-MLKL



**Figura 9. Representación esquemática de la ejecución de la necroptosis.**

Modificada de Yuan et al., 2019. La dimerización RIPK1 la activa y promueve la dimerización u oligomerización de RIPK3 y su fosforilación. La fosforilación de MLKL por RIPK3 da lugar a un cambio conformacional de MLKL que expone sitios de unión a fosfatidilinositol fosfato (PIP). MLKL fosforilada se une directamente a PIPs y cardiolipina en la membrana plasmática o membranas de organelos, lo que provoca perforaciones de la membrana y la lisis celular. El mecanismo preciso no está claro, pero esto puede ocurrir directamente a través de la oligomerización MLKL y la formación de poros o indirectamente a través de su interacción con proteínas de membrana.

La vía de señalización RIPK1-RIPK3-MLKL fue descrita originalmente como una cascada de señalización involucrada en la ejecución de necroptosis en la célula. La necroptosis es una forma de muerte celular en la que las células hacen poros en la membrana plasmática induciendo necrosis. Inicia a partir de receptores de muerte como TNFR1. La activación de TNFR1 promueve la activación de la proteína RIPK1, que es una cinasa, y la formación del complejo RIPK1-RIPK3-MLKL. El paso clave en esta vía es la fosforilación de MLKL por RIPK3 que al acumularse en la membrana plasmática causa poros, llevando a la muerte necrótica (Figura 9) (Grootjans et al., 2017). La fosforilación de MLKL genera un cambio conformacional que expone sitios de unión a fosfatidilinositol fosfato y cardiolipina, moléculas ampliamente presentes en la membrana celular y de los organelos. El mecanismo preciso por el que MLKL actúa sobre la morfología membranal aún no es claro, sin embargo, se han propuesto tres modelos de acción, dos directos y uno indirecto. Indirectamente, MLKL podría interactuar con proteínas de membrana (Yuan et al., 2019) y de manera directa se propone que MLKL podría actuar como surfactante sobre la membrana celular o que

podría inducir curvaturas que generarían poros de lípidos y proteínas (Flores-Romero et al., 2020,).

#### 4.4.1 Funciones no canónicas de MLKL

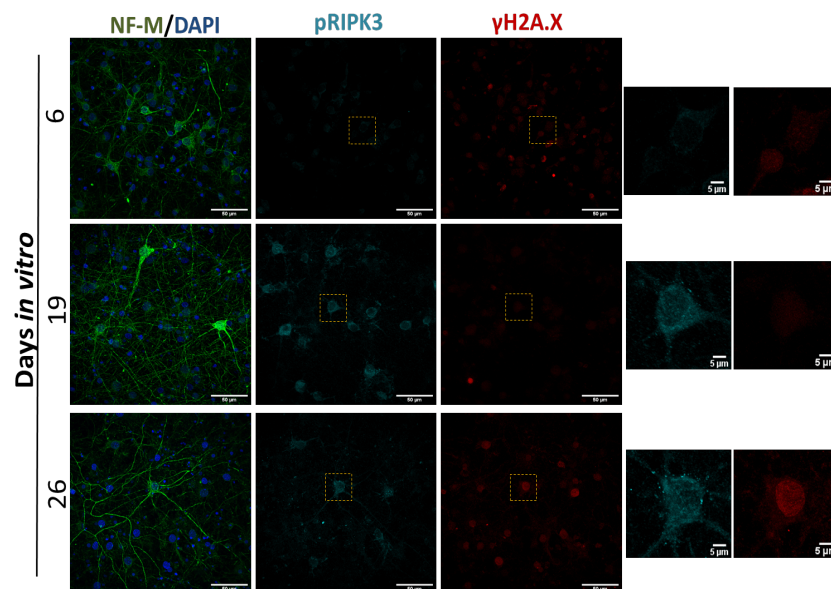
Interesantemente, la vía RIPK1-RIPK3-MLKL no participa únicamente en la necroptosis. En células dendríticas MLKL facilita el tráfico de endosomas independientemente de la inducción de necroptosis y RIPK3 promueve la liberación de MLKL en vesículas, esta liberación contribuye a la comunicación celular (Yoon et al., 2017). En células HeLa RIPK1 y RIPK3, pueden formar complejos ante señales de necroptosis, que incluyen a la fosfatasa mitocondrial PGAM5. PGAM5 puede defosforilarse y activar a la proteína DRP1, clave en el proceso de fisión mitocondrial (Wang et al., 2012a). La relación entre PGAM y DRP1 recientemente se ha asociado a rescate de la neurodegeneración empleando la fisión mitocondrial como mecanismo, tras la señalización con interferón beta (Tresse et al., 2021).

MLKL fosforilada puede translocarse también hacia el núcleo celular, que como resultado de su fosforilación sufre un cambio conformacional. El tiempo entre la acumulación nuclear y la muerte celular, sugiere que la traslocación nuclear de MLKL ocurre primero que la membranal. Aún no se sabe cuál es la función de MLKL dentro del núcleo celular (Yoon et al., 2016).

## 5 Antecedentes

En el laboratorio se tiene un modelo *in vitro* de senescencia neuronal útil para estudiar los mecanismos moleculares involucrados en la geroconversión, ya que reproduce las características de senescencia neuronal que ocurren durante el envejecimiento del cerebro y desarrollan un SASP funcional. Consiste en mantener cultivos primarios de neuronas corticales de rata por 26 días (desde los 20 días se observan ya características de senescencia), sin administración de algún tipo de estrés adicional (Moreno-Blas et al., 2019). Como se mencionó anteriormente, empleando este modelo se determinó que el flujo autofágico se encuentra alterado durante la senescencia neuronal, lo cual causa el fenotipo senescente en neuronas. Pero el mecanismo molecular que causa el fallo del flujo autofágico en neuronas senescentes continúa como una pregunta abierta.

Considerando los antecedentes relacionados a la fragmentación axonal mediado por la vía de señalización RIPK1-RIPK3-MLKL, en un trabajo preliminar del laboratorio se evaluó si durante la senescencia neuronal se activa esta vía. Como se muestra en la figura 10, se encontró que la fosforilación de RIPK3 (pRIPK3) aumenta en las neuronas senescentes con respecto a las neuronas cultivadas solo por 6 días, indicando la activación de la vía. Si bien hay un poco de pRIPK3 en neuronas jóvenes (6 DIV), resultó notorio que cambia no solo su abundancia sino también su localización conforme avanza el tiempo de cultivo. Es más notoria pRIPK3 a lo largo de los axones de las neuronas senescentes en contraste con la señal nuclear de pRIPK3 en neuronas jóvenes.



**Figura 10. Señal citoplásmica de pRIPK3 en neuronas senescentes.**

Imágenes representativas de las obtenidas en el microscopio confocal; en verde se muestran neurofilamentos intermedios (NF-M), en turquesa pRIPK3 y en rojo la señal de  $\gamma$ H2AX, Imágenes representativas de neuronas con 6 DIV, 13 DIV y 26 DIV, en los acercamientos se observa la distribución de pRIPK3 en neuronas senescentes ( $\gamma$ H2AX positivas). Datos no publicados de Daniel Moreno Blas.

Estos resultados preliminares sugieren que la activación de RIPK3 puede ser un mecanismo río arriba de degeneración axonal en neuronas senescentes y un posible inductor de senescencia celular en neuronas. La inhibición de RIPK1 con Necrostatina 1 reduce la senescencia neuronal detectada por actividad de beta galactosidasa asociada a la senescencia, lo cual refuerza la propuesta (datos no publicados).

Aunque ya no se dividen, las células senescentes todavía están vivas, ya que tienen la capacidad de metabolizar y secretar compuestos que pueden afectar la estructura y la función de los tejidos que las rodean. En nuestro modelo de senescencia neuronal *in vitro*, se comprobó que las neuronas pueden producir y secretar un SASP funcional indicando que están vivas (Moreno-Blas et al., 2019), por lo que RIPK1-RIPK3-MLKL no estarían participando en procesos de necroptosis en este caso. Pensamos entonces que MLKL tiene una función alternativa (no canónica). Considerando que la función lisosomal y su fusión con los autofagosomas depende de la integridad de los microtúbulos, que MLKL tiene la capacidad de alterar la estructura de membranas y que puede interferir con la autofagia, pensamos que la fosforilación de MLKL podría llevar a la disfunción lisosomal.

La identificación de los mecanismos detrás de la autofagia disfuncional como un mecanismo clave en la senescencia neuronal es relevante para entender mejor la fisiología de estas células y en un futuro el posible desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para evitar o reducir el envejecimiento fisiológico del cerebro y la neurodegeneración. Este trabajo busca entender si la vía pRIPK1-pRIPK3-MLKL tiene un papel en el establecimiento del fenotipo senescente neuronal interfiriendo con la morfología y acidez lisosomal, que reduciría el flujo autofágico promoviendo la senescencia neuronal.

## 6 Hipótesis

La forma fosforilada de MLKL ocasiona alteraciones en la morfología y acidificación lisosomal, lo que contribuye al establecimiento de la senescencia neuronal.

## 7 Objetivo General

Determinar si la proteína MLKL fosforilada altera la morfología lisosomal y cambia su pH, en un modelo *in vitro* de senescencia neuronal.

## 8 Objetivos particulares

- Caracterizar la dinámica de los cambios en la morfología lisosomal durante la geroconversión de neuronas corticales.
- Determinar si existe una correlación entre los cambios en la morfología lisosomal y cambios en el pH lisosomal.
- Estudiar si la forma fosforilada de MLKL se localiza en la membrana de lisosomas con morfología alterada.
- Evaluar si se recupera la morfología y el pH lisosomal al inhibir la vía de fosforilación de MLKL con Necrostatina 1 (Nec1).

## 9 Material y métodos

Los números de catálogo y características de los reactivos empleados se especifican en el anexo 12.1.

### 9.1 Cultivo de neuronas corticales de rata Wistar

Las ratas Wistar (WI) se obtuvieron del Bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Los animales fueron mantenidos en cuartos a 22°C con ciclos de luz oscuridad de 12h y con disponibilidad *ad libitum* de alimento y agua. El cuidado y experimentación fue realizado de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y siguiendo la guía internacional para el uso y cuidado de animales de laboratorio (*National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*) para el manejo de animales de laboratorio. El protocolo fue aprobado por el Comité Interno del Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL SCO174-21).

Se extrajeron embriones de ratas de 17 días de gestación. Se aisló la corteza cerebral y disoció con tripsina-EDTA durante 3 minutos (1µL por cada corteza). Para disgregar el tejido mecánicamente, se pipeteó con una pipeta Pasteur (100 veces) y las células se sembraron a una densidad de  $1.0 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> en cajas de 12 pozos sobre cubreobjetos de vidrio, el protocolo detallado y las soluciones empleadas se encuentran en el anexo 12.3. Las cajas de cultivo y los cubreobjetos se trataron con poli-L-lisina 24 horas antes de sembrar las células. Para sembrar las células y mantenerlas en cultivo se empleó medio Neurobasal suplementado con B27, GlutaMAX y gentamicina (cantidades en el Anexo 12.2). Cada 6 días se cambió la mitad de medio por medio nuevo. Los cultivos se mantuvieron a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>. Los experimentos se realizaron a los 6 días *in vitro* DIV (cultivo joven), 13 DIV, 20 DIV y 26 DIV (cultivo senescente).

### 9.1.2 Tratamientos con necrostatina

Las células se mantuvieron por 6 días *in vitro* a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Al día 6 *in vitro* las células fueron tratadas con Necrostatina 1 a una concentración final de 100 µM. Posteriormente se mantuvieron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> hasta alcanzar 13 DIV, 20 DIV y 26 DIV cambiando la mitad del medio con medio Neurobasal completo cada 6 días.

## 9.2 Tinción con lysotracker para estudiar morfología lisosomal

La tinción se realizó en células sembradas sobre cubreobjetos de vidrio. Se prepararon soluciones de tinción frescas en medio Neurobasal a 37°C antes de cada experimento. Para teñir los lisosomas se utilizaron 450 µL de una solución 70nM de LysoTracker Red por pozo la cual se incubó 15 minutos a 37°C sin agitación. Se realizó un lavado con PBS 1X para posteriormente teñir los núcleos con 450 µL de una solución 0.2 µg/mL de Hoechst 33258 por pozo. Se incubó 15 minutos a 37°C sin agitación y se lavó cada pozo con 450 µL de PBS. Se retiró el PBS y se añadieron 500 µL de medio Neurobasal completo (Anexo 12.2). Las muestras se observaron en el microscopio confocal LSM800 con incubadora, las células se mantuvieron a 37°C durante todo el curso del experimento. Por cada célula se fotografiaron 10 planos, con una separación de 0.36 µm entre cada uno de ellos.

### 9.2.1 Cuantificación y clasificación de lisosomas

Las imágenes obtenidas fueron binarizadas en el software Fiji y sometidas a análisis de partículas. Se contaron y clasificaron las partículas presentes en cada plano, de acuerdo a la tabla 1. El campo claro de cada una de las imágenes se empleó para delimitar el área del soma y únicamente se cuantificaron los lisosomas presentes en esta área. Para cada célula se obtuvo el porcentaje del soma que ocupaba cada tipo de lisosoma y el número de cada tipo de lisosoma presente. Los valores obtenidos de los 10 planos se promediaron. Este análisis se realizó para 100 células por condición, provenientes de 3 experimentos independientes.



**Tabla 1.** Parámetros empleados para la clasificación de los lisosomas (Gorostieta-Salas, Moreno-Blas, Geronimo-Olvera, et al., 2021)

Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Circularidad	Clasificación otorgada
0.1-10	0.6-1.0	Lisosomas circulares
0.1-10	0.0-0.6	Lisosomas de baja circularidad
10-100	0.0-1.0	Lisosomas agrandados

### 9.3 Medición de pH lisosomal

#### 9.3.1 Tinción con AztecLysopH

La tinción se realizó en células sembradas a una densidad de  $1.0 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> sobre cubreobjetos de vidrio. Se prepararon soluciones de tinción frescas en medio Neurobasal a 37°C antes de cada experimento. Se tiñeron los núcleos con 450  $\mu\text{L}$  por pozo de una solución 0.2  $\mu\text{g/mL}$  de Hoechst 33258 la cual se incubó 5 minutos, posteriormente se añadieron 450  $\mu\text{L}$  por pozo de una solución 40nM de AztecLysopH (Sintetizado y donado por el grupo del Dr. Arturo Jiménez del Instituto de Química, UNAM), la cual se incubó 5 minutos a 37°C sin agitación. Se lavó cada pozo con 450  $\mu\text{L}$  de PBS 1X. Se retiró el PBS y se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de medio Neurobasal completo. Las muestras se observaron en el microscopio confocal LSM800 con incubadora, las células se mantuvieron a 37°C durante todo el curso del experimento. Por cada célula se fotografiaron 10 planos, con una separación de 0.36  $\mu\text{m}$  entre cada uno de ellos. Se analizaron 100 células por ventana temporal provenientes de 3 experimentos independientes utilizando un objetivos 63x/1.4.

##### 9.3.1.1 Cálculo de pH lisosomal

Las imágenes obtenidas fueron binarizadas en el software Fiji y sometidas a análisis de partículas. Se contaron y clasificaron las partículas presentes en cada plano de acuerdo a la sección 6.2. Para cada partícula se obtuvo la intensidad de fluorescencia roja y verde, la cual posteriormente se empleó con la ecuación 1 para obtener el valor de pH. Este análisis se realizó para 100 células por condición, provenientes de 3 experimentos independientes.

$$pH = pK_{a_{AztecLyso^{pH}}} + \log\left(\frac{\text{Intensidad de fluorescencia Verde}}{\text{Intensidad de fluorescencia Roja}}\right)$$

Ecuación 1. Ecuación empleada para calcular el pH lisosomal

### 9.3.2 Tinción con Lysosensor yellow/blue DND90

Las células se sembraron a una densidad de  $1.0 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> en cajas de 15mm con fondo de vidrio. Se prepararon soluciones de tinción frescas en medio Neurobasal a 37°C antes de cada experimento. Se tiñeron los lisosomas con 900 µL de una solución 1:10,000 de Lysosensor yellow/blue DND90 la cual se incubó 5 minutos a 37°C sin agitación. Se lavó con 900 µL de PBS 1X. Se retiró el PBS y se añadieron 1500 µL de medio Neurobasal completo.

#### 9.3.2.1 FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy, Microscopia de Tiempo de vida de Fluorescencia)

Las muestras se observaron en un microscopio confocal construido con la técnica de conteo de fotones individuales, con láseres y detectores de avalancha MPD acoplados al contador picoharp3000 (Picoquant).

Por cada célula se fotografió 1 plano empleando un objetivo 60X Plan Apo VC (Nikon, MRD01602) y un láser de 355nm a una intensidad de 5.8 para excitar las moléculas de Lysosensor a una frecuencia de 10 mHz.

Para la separación de ambas señales, se emplearon un filtro magenta (Thor Labs, FD1M) y un filtro short pass.

Las imágenes obtenidas fueron analizadas con el software de tiempo de vida media de fluorescencia y correlación SymPhoTime. Se definió como región de interés el soma de cada neurona, excluyendo la superficie del núcleo. Para neurona se obtuvo el tiempo de vida media promedio y las cuentas asociadas a cada tiempo de vida media. Este análisis se realizó para 10 células por condición, provenientes de 3 experimentos independientes.

Las imágenes obtenidas fueron binarizadas en el software Fiji y sometidas a análisis de partículas. Se contaron y clasificaron las partículas presentes en cada plano de acuerdo a la sección 6.2. Para cada partícula se obtuvo la intensidad de fluorescencia azul y amarilla, la cual posteriormente se empleó con la ecuación 2 para obtener el valor de pH. Este análisis se realizó para 30 células por condición, provenientes de 3 experimentos independientes.

$$pH = pK_{a_{Lysosensor\ Yellow/Blue}} + \log\left(\frac{\text{Intensidad de fluorescencia Azul}}{\text{Intensidad de fluorescencia Amarillo}}\right)$$

Ecuación 2. Ecuación empleada para calcular el pH lisosomal

#### 9.4 Inmunofluorescencia

Las células se sembraron a una densidad de  $1.0 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> sobre cubreobjetos de vidrio. Las células se fijaron con metanol 100% en hielo por 20 minutos y luego enjuagadas con PBS 1X y permeabilizadas con PBS/Tritón 0.5% por 5 minutos. El bloqueo se realizó con PBS/BSA 5% /Tween 0.5% por 30 minutos. Los anticuerpos primarios se incubaron toda la noche a 4°C. Después de 3 lavados con PBS/Tween 0.5%, se incubó el anticuerpo secundario con las células por una hora a TA. Los anticuerpos primarios y secundarios se diluyeron en PBS/ Tween 0.1% /Tritón 0.25% a las concentraciones que se describen a continuación: Pollo anti  $\beta$ -Tubulina clase III (1:200), ratón anti-LAMP1 (1: 150), Conejo anti-MLKL fosforilada en la serina 345 (1:500), Conejo anti-MLKL (1:500), Alexa 488 Fluor anti-ratón (1:500), Alexa 594 Fluor anti-conejo (1:500), Alexa 647 Fluor anti-pollo (1:500). Las imágenes fueron adquiridas utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM 800 y procesadas utilizando el Software Fiji.

#### 9.5 Análisis estadístico

Todos los datos fueron analizados y graficados utilizando el programa Prisma 6 (GraphPad Software Inc). Los análisis estadísticos se especifican en el pie de figura correspondiente a cada gráfica.

## 10 Resultados

10.1 Los lisosomas agrandados y de baja circularidad incrementan en el soma de neuronas corticales conforme se van volviendo senescentes.

En el modelo de senescencia neuronal *in vitro* desarrollado en el laboratorio se observó un aumento en la cantidad de lisosomas en neuronas senescentes (cultivadas 26 DIV) en comparación con neuronas jóvenes (cultivadas 6 DIV) (Moreno-blas et al., 2019), con una morfología diferente, en ocasiones tubular.

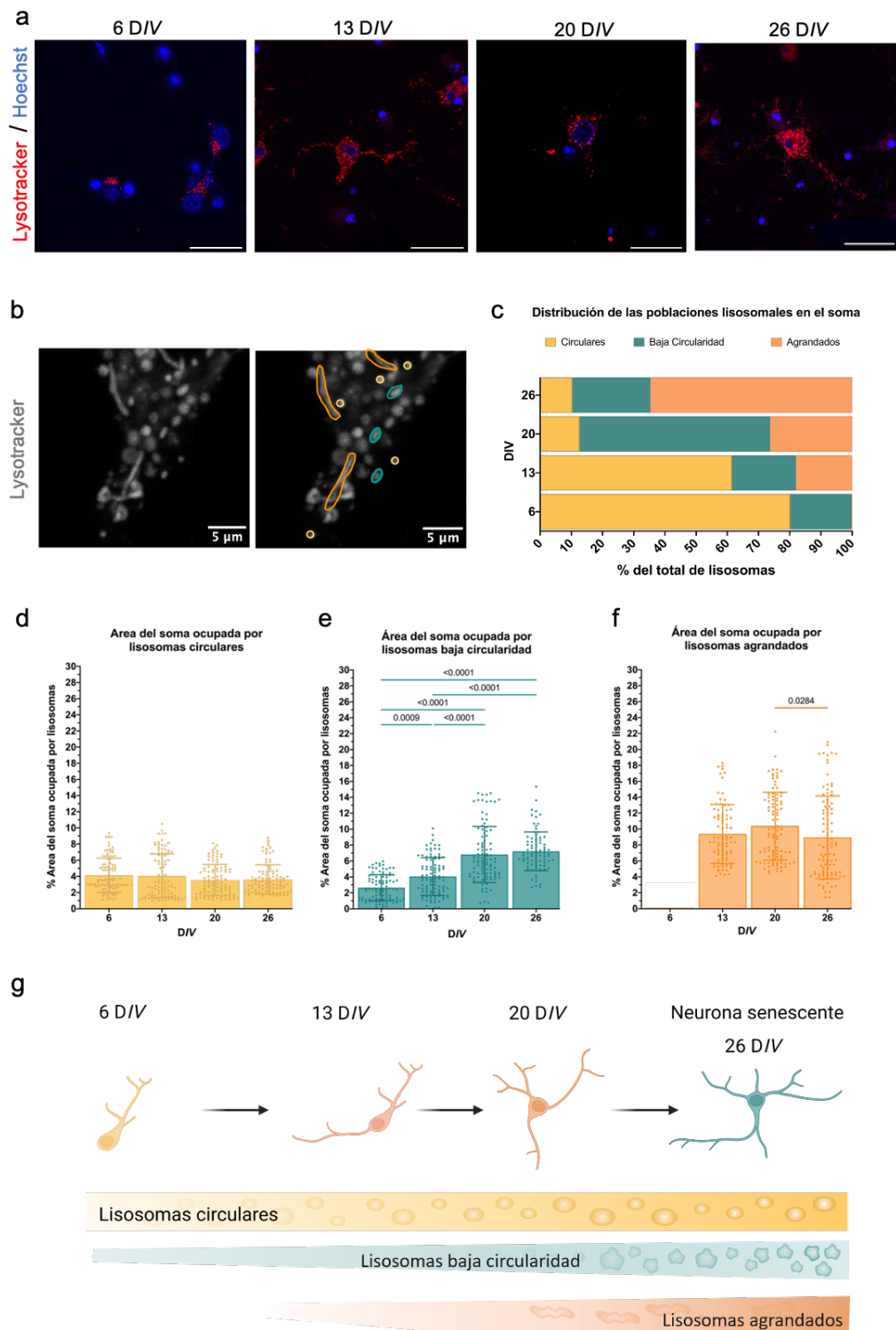
La hipótesis de trabajo es que los lisosomas amorfos pueden contribuir a la geroconversión de las neuronas al impedir el flujo autofágico ya que no son funcionales. Para poner a prueba esa hipótesis, se evaluaron los cambios en la morfología de los lisosomas en cultivos de distintas edades, ya que tales cambios deberían ocurrir antes de que las neuronas adquirieran el fenotipo senescente.

A los 6 DIV y 13 DIV, las neuronas aún no presentan características de senescencia, mientras que a partir de los 20 DIV ya se detecta actividad de SA- $\beta$ gal y alteraciones en la morfología nuclear característicos de la senescencia (datos no publicados) y a los 26 DIV ya se observa acumulación de lipofuscina, incremento en p21<sup>CIP/WAF1</sup>, focos de  $\gamma$ H2AX, sobreexpresión de GATA4 y producción de SASP (Moreno-blas et al., 2019).

Como se observa en la figura 11a, la cantidad de lisosomas detectados con LysoTracker aumentó desde los 13 DIV. Se llevó a cabo un estudio sistemático sobre la dinámica de los cambios en la morfología lisosomal durante el cultivo, clasificando los lisosomas en tres grupos según su forma: con baja circularidad, circulares y agrandados (Métodos tabla 1, anexo 13.4) como se ejemplifica en la Figura 11b. Encontramos que en las neuronas jóvenes (6 DIV) el 80% de los lisosomas son circulares, lo cual contrasta con las neuronas senescentes (26DIV), en las cuales el 70% de los lisosomas presentes son agrandados (Fig. 16c). Los lisosomas circulares y de baja circularidad se observan desde el sexto día de las neuronas en cultivo y se encuentran predominantemente en el soma de las neuronas. Los lisosomas agrandados se observan a partir del día 13 en cultivo distribuidos en el soma y los axones de las neuronas (Fig. 11a). Dadas la dificultad de cuantificar a los lisosomas en los axones individualmente se decidió estudiar como primer abordaje únicamente los lisosomas presentes en el soma de las neuronas corticales.

Cada tipo lisosomal muestra una dinámica distinta, en el caso de los lisosomas circulares se observó que se mantiene un porcentaje constante de ellos a lo largo del tiempo en cultivo (Fig.11d). Los lisosomas de baja circularidad presentaron un incremento gradual y proporcional al tiempo en cultivo (Fig.11e) y los lisosomas agrandados se encontraron presentes a partir del día 13 *in vitro* (Fig.11f). En un estudio previo se observó que la inhibición farmacológica de la autofagia a los 6 o 13 DIV promueve un incremento en el porcentaje de neuronas senescentes (Moreno-

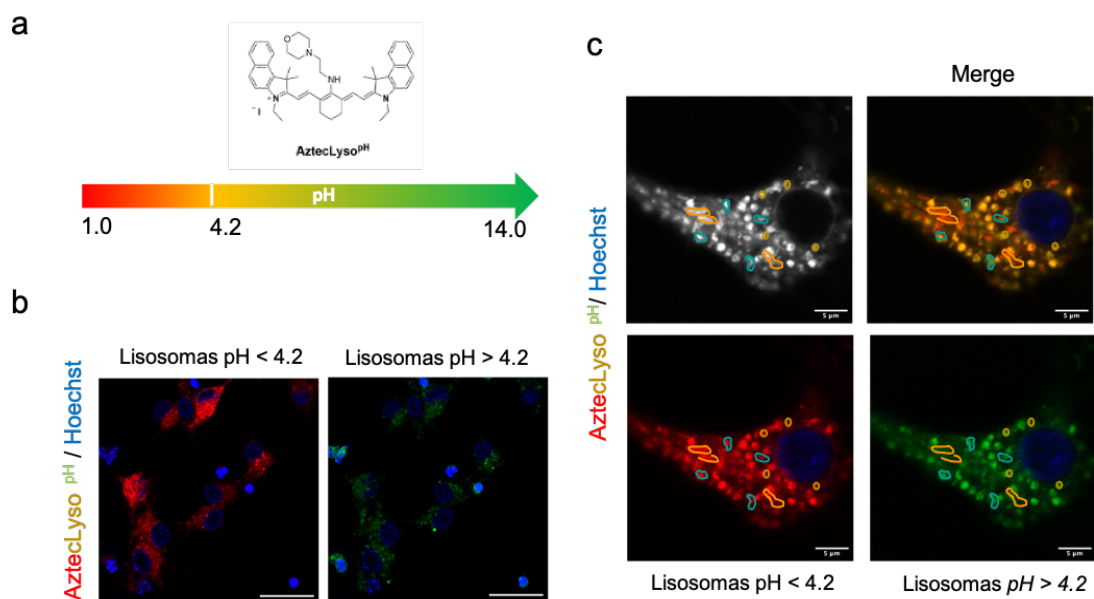
blas et al., 2019). Considerando estos resultados y la temporalidad del establecimiento de senescencia en el cultivo, los lisosomas agrandados y de baja circularidad en el soma podrían contribuir al establecimiento de la senescencia neuronal *in vitro* al tener una morfología anormal que los llevaría a participar inadecuadamente en la autofagia.



**Figura 11. Los lisosomas agrandados y de baja circularidad incrementaron conforme las neuronas se van volviendo senescentes.**

a) Imágenes representativas de las obtenidas en el microscopio confocal en rojo se muestran los lisosomas teñidos con LysoTracker y en azul los núcleos teñidos con Hoechst. Imágenes representativas de tres experimentos independientes. Las barras de escala representan 25  $\mu\text{m}$ . b) Clasificación empleada para analizar los lisosomas, en escala de grises se muestran los lisosomas teñidos con LysoTracker. Las líneas naranjas muestran el contorno de los lisosomas agrandados, las líneas azules muestran el contorno de los lisosomas de circularidad baja y los círculos amarillos delimitan a los lisosomas circulares. Imágenes representativas de una neurona de 13 días in vitro. c) Distribución de las poblaciones lisosomales calculadas respecto al total de lisosomas en el soma. d-f) Área del soma ocupada por lisosomas circulares, baja circularidad o agrandados. En todas las gráficas (c-f) se cuantificaron 100 células por condición provenientes de tres experimentos independientes. Las barras representan la desviación estándar y los números los valores calculados para P empleando Kruskal-Wallis como prueba estadística seguida por la prueba post hoc Dunn. A los 6 DIV solo se encontró una célula con lisosoma agrandado, por lo que no se incluyó en la gráfica. g) Resumen gráfico. Los lisosomas de baja circularidad y los agrandados incrementan en neuronas senescentes a partir del día 13 in vitro. El ancho de la barra representa la abundancia de ese tipo lisosomal en el soma

## 10.2 La acidez de los lisosomas incrementó en neuronas senescentes



**Figura 12. AztecLyso<sup>pH</sup> permite monitorear el pH lisosomal y observar la morfología de los lisosomas.**

a). Estructura química del AztecLyso<sup>pH</sup>, abajo se muestra una representación de la escala de pH asociada al espectro de color. b) Imagen representativa de lisosomas teñidos con AztecLyso<sup>pH</sup> y núcleos con Hoechst. La imagen de la izquierda corresponde a la señal de emisión del AztecLyso<sup>pH</sup> protonado (lisosomas ácidos) y la imagen de la derecha a la emisión de la forma desprotonada del AztecLyso<sup>pH</sup> (lisosomas menos ácidos). Barra de escala representa 25  $\mu\text{m}$ . c) Clasificación empleada para los lisosomas presentes en la neurona, en escala de grises se muestran los lisosomas teñidos con AztecLyso<sup>pH</sup>. En rojo se muestra la contribución de AztecLyso<sup>pH</sup> protonado y en verde la de la forma desprotonada del AztecLyso<sup>pH</sup>. Las líneas naranjas muestran el contorno de los lisosomas agrandados, las líneas azules muestran el contorno de los lisosomas de circularidad baja y los círculos amarillos delimitan a los lisosomas

circulares. Imágenes representativas de una célula con 13 días *in vitro*, la barra de escala representa 25  $\mu\text{m}$ .

Para que los lisosomas funcionen correctamente, es importante que mantengan su forma circular y tamaño (de Araujo et al., 2020). Una de sus funciones principales es descomponer componentes celulares con hidrolasas que requieren un pH óptimo de entre 4.0 y 5.0. Con el fin de conocer si existe una diferencia fisiológica asociada a la morfología entre los tres tipos de lisosomas observados, se monitoreó el pH lisosomal con el sensor de pH lisosomal AztecLyso<sup>pH</sup>. Este sensor es una molécula sintetizada por el grupo de trabajo del Dr. Arturo Jiménez del Instituto de Química de la UNAM que emite a 640 nm a pH menor a 4.2 y a 511 nm a pH mayor a 4.2 (Fig. 12a, b) y puede utilizarse para medir el pH en el interior del lisosoma. Se corroboró que los lisosomas teñidos con esta molécula pueden clasificarse morfológicamente de la misma manera que los teñidos con Lysotracker (Figura 12c).

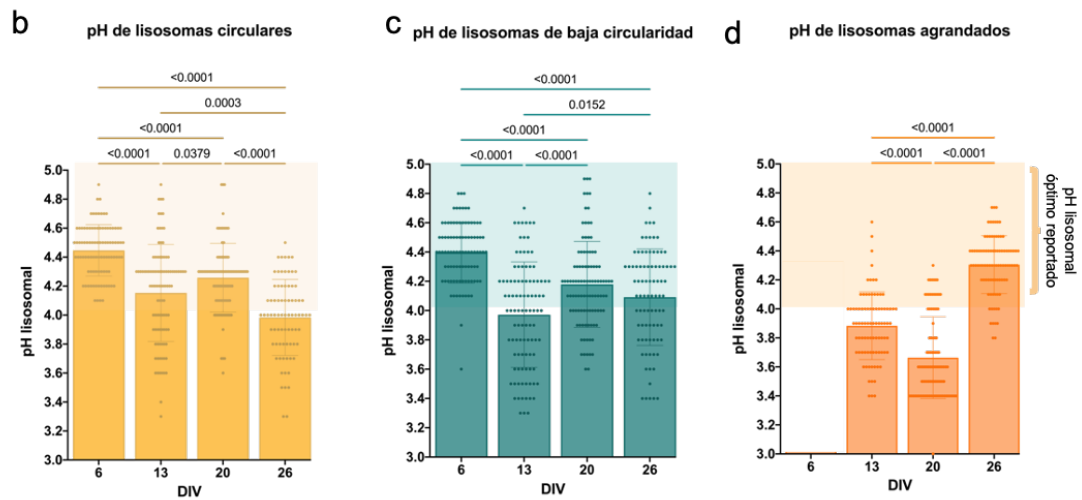
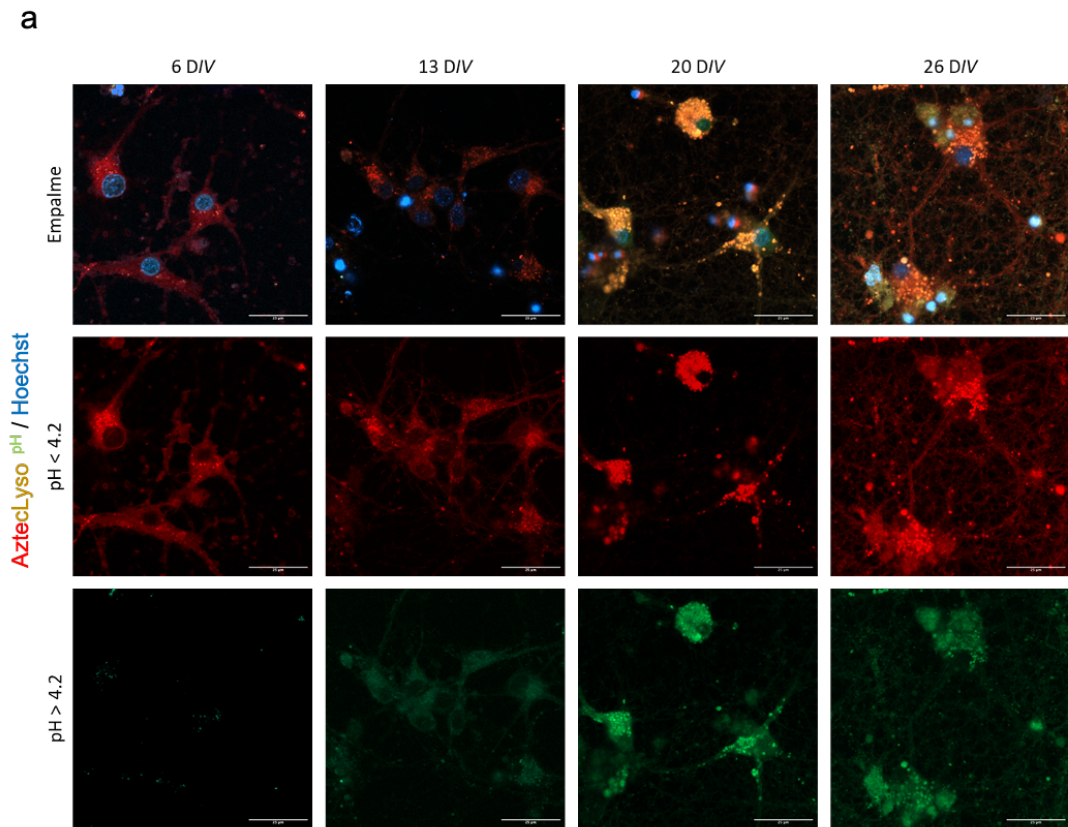
Como se puede observar en la figura 13a, se realizaron mediciones de pH lisosomal a los 6 DIV, 13 DIV, 20 DIV y 26 DIV, distinguiendo su morfología.

El pH de los lisosomas circulares disminuye gradualmente con el tiempo en cultivo, alcanzando un máximo de 4.0 a los 26 DIV el cual es considerado como el límite inferior del intervalo de pH óptimo lisosomal (Frese et al., 2008; Lehner & Quiroga, 2016; Linebaugh et al., 1999; Saha et al., 1979; Trivedi et al., 2020)

En el caso de los lisosomas de baja circularidad se observó un incremento de acidez a los 13 DIV respecto a los 6 DIV, alcanzando un pH debajo de 4.0. Considerando que la escala de pH es logarítmica, el cambio observado puede ser biológicamente significativo. Sin embargo, se detectó una recuperación del pH óptimo a los 20 DIV que se mantuvo a los 26 DIV (Figura 13c).

A los 6 DIV solo se encontró una célula con 2 lisosomas agrandados, por lo que no se incluyó en la gráfica. El pH de los lisosomas agrandados varía con el tiempo, con un valor de 3.9 a los 13 DIV, 3.6 a los 20 DIV, y recuperándose a 4.3 al día 26 *in vitro*. Los primeros dos valores mencionados corresponden a una acidez mayor a la reportada como óptima para función de las enzimas lisosomales, lo cual podría comprometer la función de las enzimas lisosomales a los 13 y 20 días *in vitro*. En las neuronas senescentes la acidez óptima parece haberse recuperado y los lisosomas agrandados alcanzan un pH de aproximadamente 4.3, que permitiría la maduración y actividad de las enzimas en su interior.

En resumen, a los 13 DIV coincide que el pH de los lisosomas de baja circularidad es menor al óptimo y que aparecen los lisosomas agrandados, también con un pH más ácido del óptimo, sugiriendo que la disfunción lisosomal precede a la geroconversión.



**Figura 13. La acidez de los lisosomas, y la presencia de lisosomas agrandados detectados con el sensor AztecLyso<sup>pH</sup> incrementó previo al establecimiento de la senescencia neuronal.**

a) Imagen representativa de microscopía confocal para detectar lisosomas teñidos con AztecLyso<sup>pH</sup> y núcleos con Hoechst. La fila superior corresponde al empalme, la fila central a la señal de emisión del AztecLyso<sup>pH</sup> protonado (lisosomas ácidos) y la fila inferior a la emisión de la forma desprotonada del AztecLyso<sup>pH</sup> (lisosomas de baja acidez). Barra de escala representa 20  $\mu\text{m}$ . **b-d)** Gráficos del pH calculado de lisosomas circulares, de baja circularidad o agrandados presentes en neuronas corticales a los 6 DIV, 13 DIV, 20 DIV y 26DIV, según se indica. Se cuantificaron 100 células por condición provenientes de tres experimentos independientes. Las barras representan la desviación estándar y los números los valores calculados para p mediante una prueba ANOVA de dos vías como prueba estadística seguida de una prueba Tukey. A los 6 DIV solo se encontró una célula con lisosoma agrandado, por lo que no se incluyó en la gráfica.

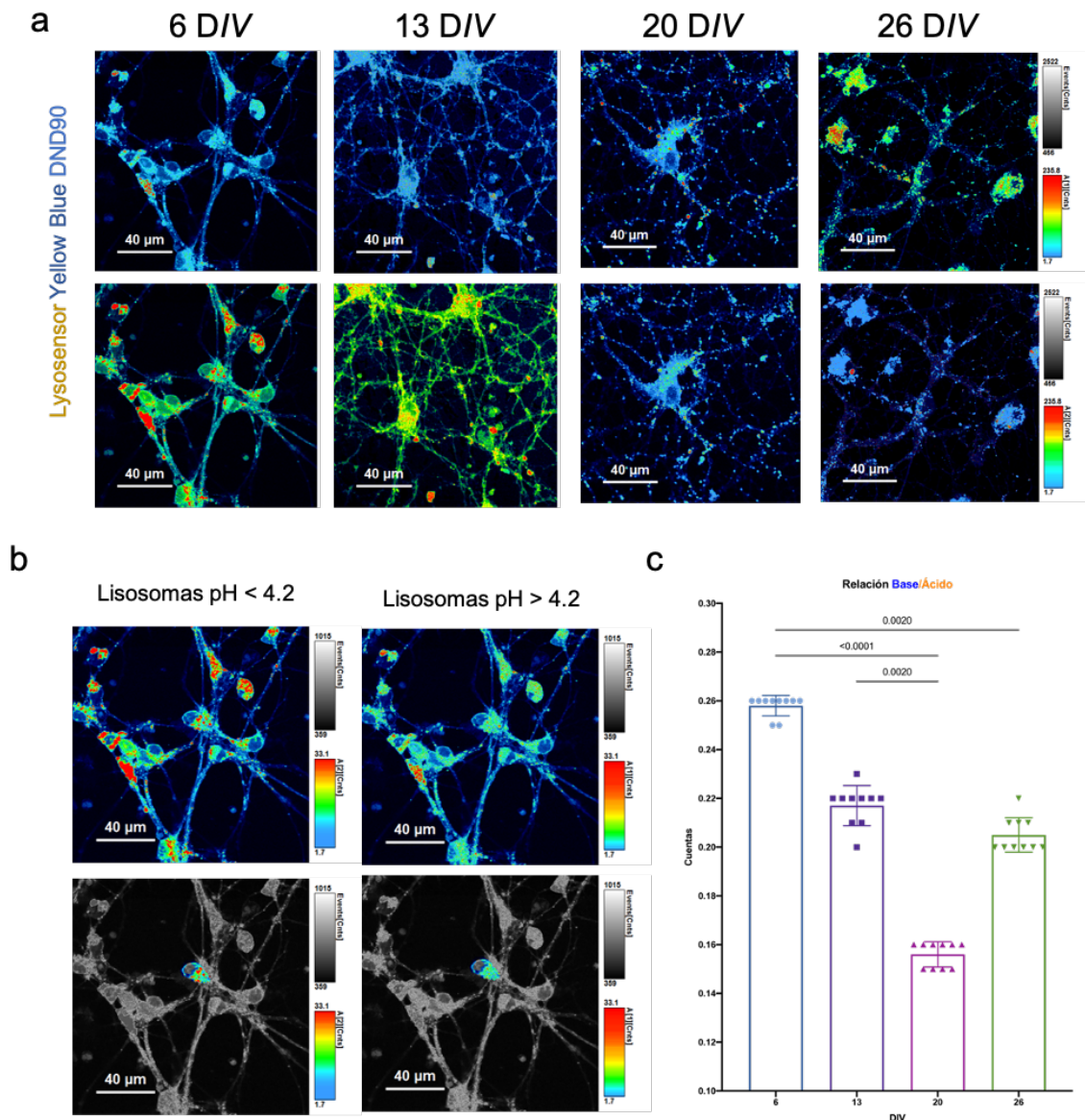


Los datos de pH lisosomal obtenidos con el sensor molecular AztecLyso<sup>pH</sup> se complementaron con mediciones empleando la molécula comercial Lysosensor Yellow Blue, ya que la molécula AztecLyso<sup>pH</sup> no se había empleado previamente en este tipo de células y cultivo. Ambas moléculas tienen un pKa de 4.2, sin embargo, los espectros de absorción y emisión de sus formas protonadas y desprotonadas varían.

El Lysosensor yellow/blue protonado y desprotonado absorbe a 329 nm y 384 nm respectivamente, al ser valores cercanos al UV empleamos un microscopio distinto al de las mediciones con AztecLyso<sup>pH</sup>, ya que la combinación de láseres disponible no permitía excitar al Lysosensor yellow/blue. Para realizarlo, se estableció una colaboración con el Doctor Jorge Peón y su laboratorio en el Instituto de Química de la UNAM, que permitió cuantificar el pH lisosomal con Lysosensor Yellow/Blue mediante la técnica de microscopía de tiempo de vida de fluorescencia (FLIM) empleando un láser de 355nm para excitarlo.

La técnica FLIM utiliza el tiempo de vida media de fluorescencia de las moléculas como característica para identificarlas y localizarlas en el plano, los resultados se expresan en cuentas correspondientes a cada especie fluorescente. En la figura 14a se muestran en la fila superior las imágenes correspondientes a las cuentas asociadas al Lysosensor desprotonado y en la inferior las que corresponden al protonado. Para cada uno de los somas (Figura 14b) se obtuvo la relación entre el número de cuentas asociadas a Lysosensor Yellow Blue protonado y Lysosensor Yellow Blue desprotonado (A2/A1).

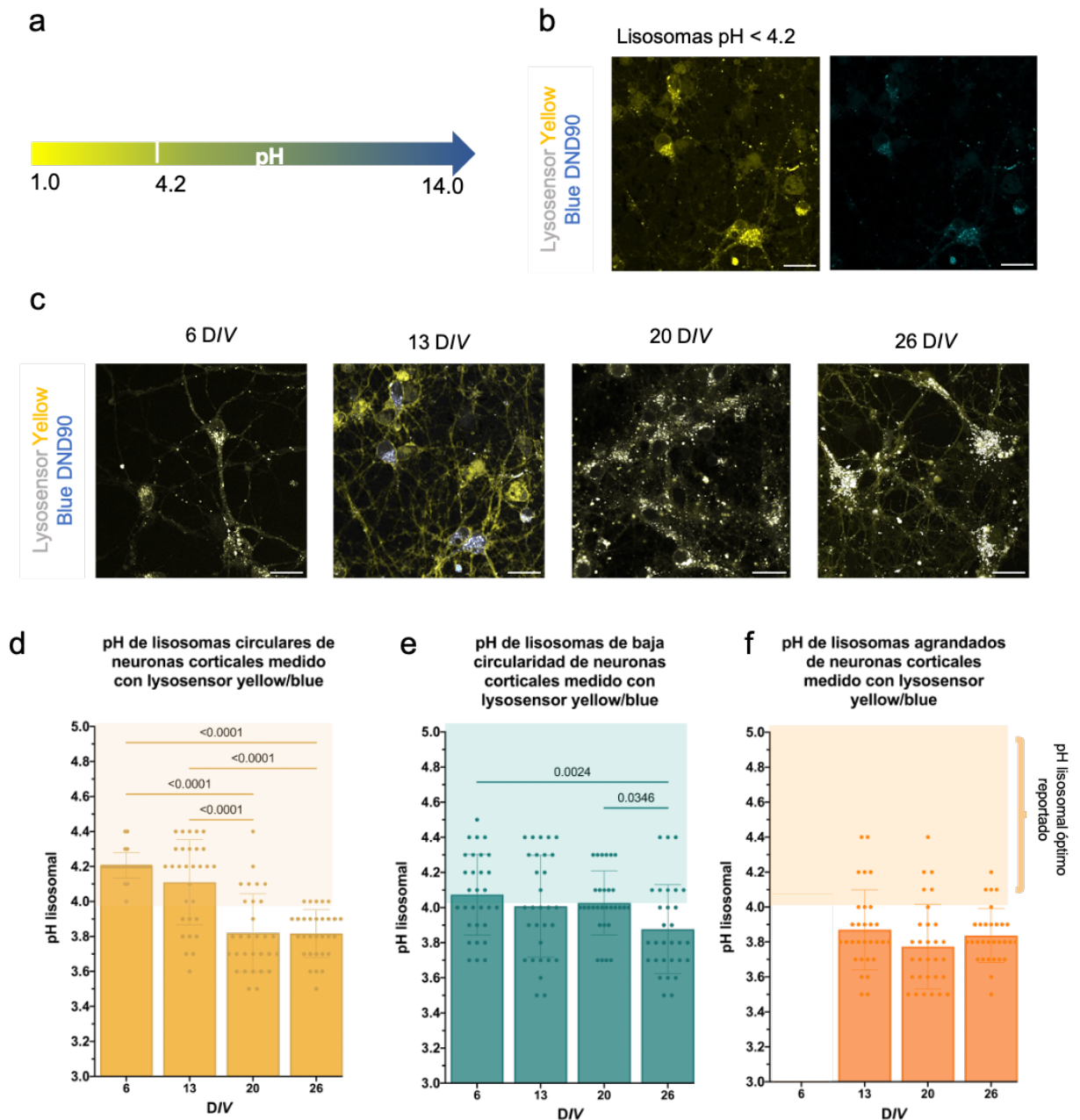
En el soma (Figura 14c) de neuronas corticales, se observó un aumento máximo de pH al día 20 *in vitro*), que correlaciona con el incremento en la acidez cuantificado con el AztecLyso<sup>pH</sup>. Sin embargo, con este primer análisis no fue posible determinar la morfología de los lisosomas ni su tamaño.



**Figura 14. La acidez lisosomal detectada con el Lysosensor Yellow/Blue tuvo variaciones dependiendo del tiempo de las neuronas corticales en cultivo.**

a) Lisosomas teñidos con Lysosensor Yellow/Blue DND90 detectados con la técnica FLIM a 6, 13, 20 y 26 DIV. La fila superior corresponde al Lysosensor desprotonado y la inferior al protonado. b) Ejemplo del ROI empleado para analizar solo los lisosomas presentes en el soma. La columna izquierda corresponde a las cuentas correspondientes del tiempo de vida media lento (Lysosensor protonado) y la columna derecha a las cuentas correspondientes al tiempo de vida media rápido (Lysosensor desprotonado) c) Gráfico la relación de cuentas correspondientes a Lysosensor protonado respecto al Lysosensor desprotonado presentes en neuronas corticales a los 6 DIV, 13 DIV, 20 DIV y 26DIV. Se cuantificaron 10 células por condición provenientes de 3 experimentos independientes.

Para realizar un análisis sobre cada grupo lisosomal se binarizaron las imágenes obtenidas y en FIJI se cuantificó la intensidad de fluorescencia de ambas especies para calcular el pH de los lisosomas diferenciando la morfología de cada uno de ellos.



**Figura 15. La acidez de los lisosomas detectada con el sensor Lysosensor Yellow/Blue DND90 incrementó en neuronas senescentes.**

a) Representación de la escala de pH asociada al espectro de color del Lysosensor Yellow/Blue DND90. b) Imagen representativa de lisosomas teñidos con Lysosensor Yellow/Blue DND90. La imagen de la izquierda corresponde a la señal de emisión del Lysosensor Yellow/Blue DND90 protonado (lisosomas ácidos) y la imagen de la derecha a la emisión de la forma desprotonada del Lysosensor Yellow/Blue DND90 (lisosomas menos ácidos). Barra de escala representa 25  $\mu\text{m}$ . c) Imágenes representativas de Lisosomas teñidos con Lysosensor Yellow/Blue presentes en neuronas corticales a los 6 DIV, 13 DIV, 20 DIV y 26 DIV. Barra de escala representa 25  $\mu\text{m}$ . d-f) Gráfico del pH calculado de lisosomas presentes en neuronas corticales a los 6 DIV, 13 DIV, 20 DIV y 26 DIV. Se cuantificaron 30 células por condición provenientes de tres experimentos independientes. Las barras representan la desviación estándar y los números los valores calculados para p calculado mediante una prueba ANOVA de dos vías como prueba estadística seguida de una prueba Tukey. A los 6 DIV solo se encontró una célula con lisosoma agrandado, por lo que no se incluyó en la gráfica.

Las mediciones menores a 500 nm se asociaron a la contribución desprotonada del Lysosensor yellow/blue y las mayores a 500 nm como las provenientes del Lysosensor yellow/blue protonado (Fig. 15a, b).

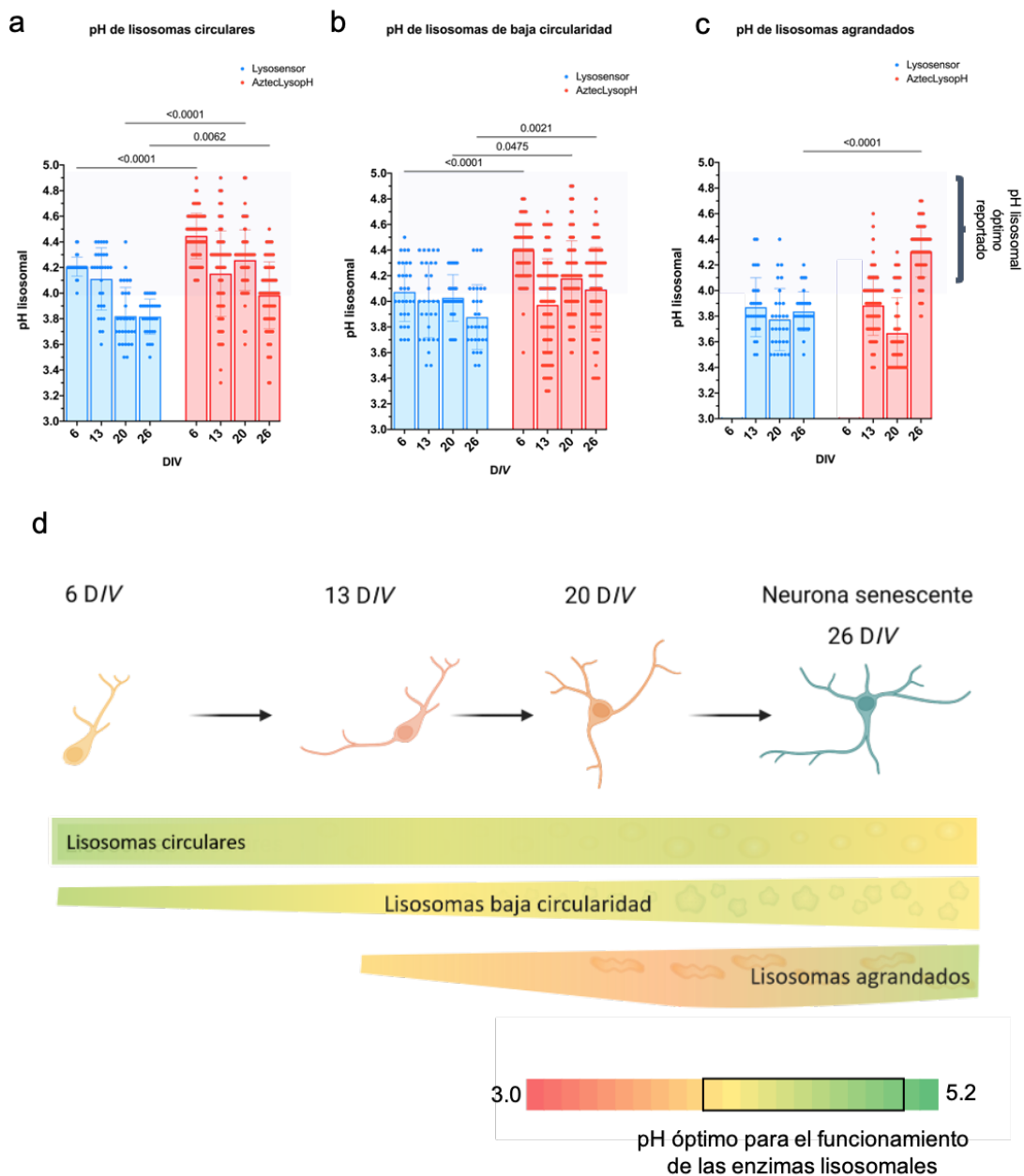
El pH de los lisosomas circulares (Fig. 15 d) inicia en 4.2, sin embargo, a partir del día 13 *in vitro* su pH disminuyó de tal modo que alcanzó un pH menor al necesario para un buen funcionamiento de sus enzimas. En el caso de los lisosomas agrandados y de baja circularidad (Fig. 15 e,f) el pH disminuyó respecto al tiempo en cultivo partiendo de valores de acidez menores a 4.0.

Estos resultados en conjunto con los del AztecLyso pH permitieron establecer que el pH en el interior de los lisosomas amorfos es tan ácido, que dificultaría que las enzimas lisosomales maduren y funcionen. Una observación interesante es que el pH lisosomal no es constante y cambia respecto a los días en cultivo de las neuronas.

Se compararon los valores de pH lisosomal obtenidos con Lysosensor Yellow Blue y los obtenidos con AztecLysopH con el fin de encontrar un pH característico asociado a cada morfología lisosomal. Este objetivo no se logró debido a las diferencias experimentales inherentes al tipo de medición efectuada y a que estas no se realizaron en las mismas condiciones de temperatura y CO<sub>2</sub> por las diferencias entre el tipo de microscopio necesario para observar cada sensor. Sin embargo, el comportamiento de las variaciones de pH para cada grupo lisosomal sí resultó constante.

Integrando las observaciones, se puede decir que a lo largo del tiempo en cultivo los lisosomas circulares se acidifican en 0.6 unidades (Fig.16a). Los lisosomas de baja circularidad aumentaron su acidez al día 13 *in vitro* y al día 20 *in vitro* disminuyeron, logrando un pH óptimo lisosomal que se mantiene al día 26 *in vitro* (Fig. 16b). En el caso de los lisosomas agrandados, su pH es menor al óptimo en los días 13 y 20 *in vitro* y se recupera al día 26 (Fig. 16c).

En resumen, el pH dentro de los lisosomas es característico para cada morfología lisosomal (Fig. 16d) y distinto entre las neuronas jóvenes y las neuronas senescentes. La mayoría de estos cambios sucedieron en los días 13 y 20, por lo cual sugerimos que los cambios morfológicos y de pH podrían contribuir al fallo de la autofagia y el establecimiento de la senescencia neuronal.



**Figura 16. La comparación de las mediciones de pH lisosomal con AztecLyso<sup>pH</sup> y Lysosensor Yellow/Blue DND90 muestra que ambas detectan el mismo patrón de incremento de acidez lisosomal a lo largo del tiempo en cultivo**

**a-c)** Comparación del pH calculado de lisosomas circulares, de baja circularidad o agrandados presentes en neuronas corticales a los 6 DIV, 13 DIV, 20 DIV y 26DIV con AztecLyso<sup>pH</sup> y Lysosensor Yellow/Blue DND90. Las barras representan la desviación estándar y los números los valores calculados para p calculado mediante una prueba ANOVA de dos vías como prueba estadística seguida de una prueba Tukey. **d)** Resumen gráfico de los cambios en abundancia y pH de cada tipo lisosomal a lo largo del tiempo en cultivo. El ancho de la barra representa la abundancia de ese tipo lisosomal en el soma y el color fue asignado de acuerdo al pH donde el 3.0 es rojo y el 5.0 verde.

Los cambios en la morfología, número y pH de lisosomas nos llevaron a pensar que estos organelos podrían estar interactuando mediante procesos de fusión y fisión que les permitiera intercambiar contenidos, incrementar su tamaño y estabilizar su pH de manera similar a como lo hacen las mitocondrias. Sin embargo, las maquinarias de fusión y fisión lisosomal no están descritas aún.

Se ha reportado que, independiente a su propiedad de formar poros en membrana celular durante la necroptosis, MLKL puede interactuar con proteínas que promueven la fisión mitocondrial y también puede unirse a fosfolípidos (Wang et al., 2012b; Zhan et al., 2021). Durante el envejecimiento MLKL fosforilada incrementa en las neuronas de corteza de rata (Thadathil et al., 2021) y de hipocampo en cerebros de ratones viejos, donde se observa de forma punteada en el citoplasma (Arrázola et al., 2023). Considerando que las neuronas senescentes, aunque tienen MLKL fosforilada (datos previos no publicados) no mueren por necroptosis, y que la inhibición de la vía RIPK1-RIPK3-MLKL evita la senescencia neuronal, sugerimos que pMLKL podría estar actuando sobre otros blancos celulares, como los lisosomas, y contribuir a los cambios en su morfología y pH.

10.3 La inhibición de RIPK1 con necrostatina, aunque también el tratamiento con DMSO, evitaron el incremento de la acidez de los lisosomas agrandados en neuronas senescentes

Con el objetivo de saber si la proteína MLKL está relacionada con los cambios en la morfología lisosomal observados en el modelo de senescencia neuronal *in vitro*, evaluamos los efectos de la inhibición de su activación sobre la morfología y pH lisosomal, así como su localización subcelular.

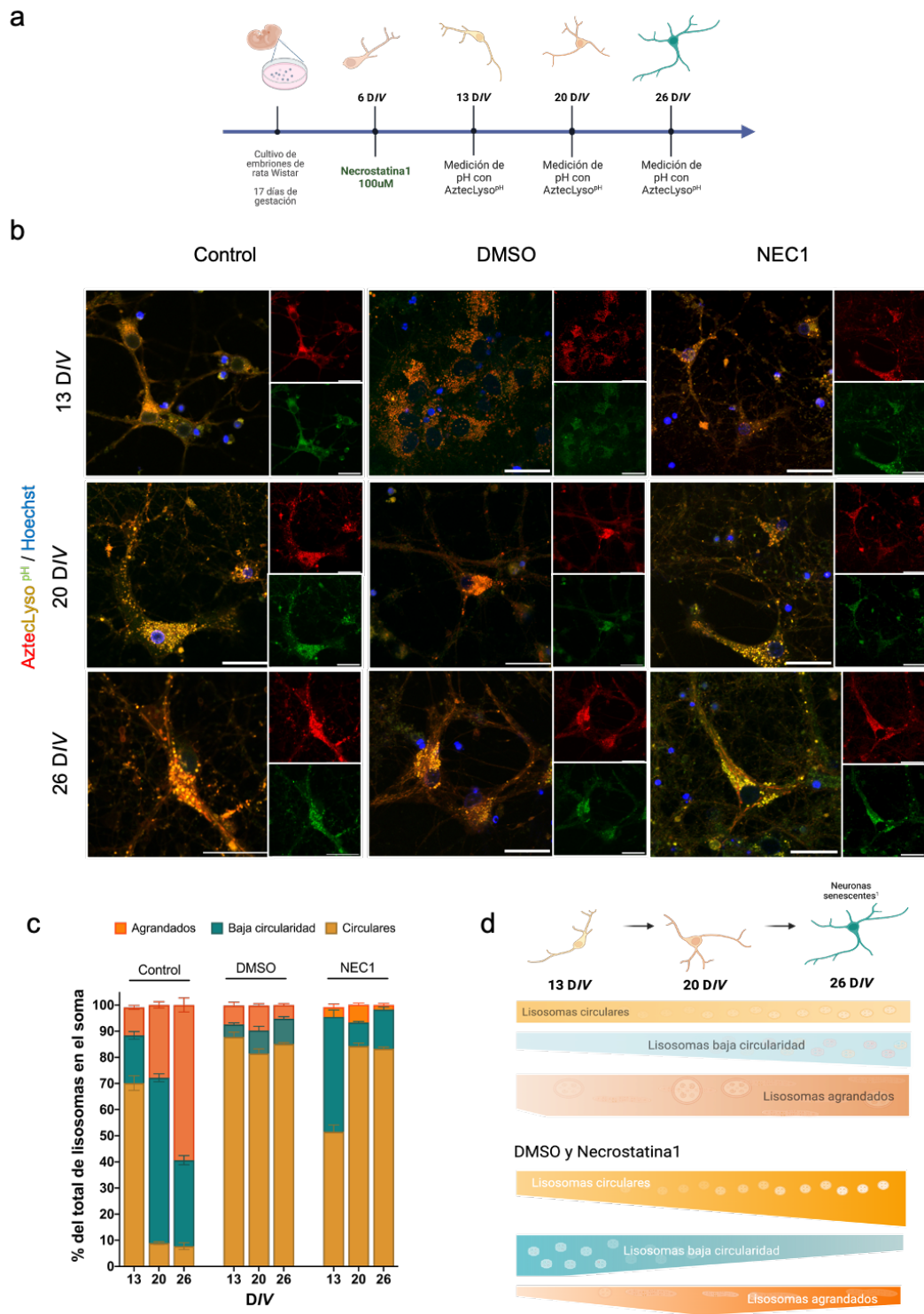
Tratamos a las células con Necrostatina 1 (Nec1) (Fig.17 a), una molécula que se une al sitio de unión a ATP de RIPK1, inhibiendo así su actividad (Degterev et al., 2008). Como se muestra en las figuras 17 y 18, la inhibición de la fosforilación de MLKL mostró un efecto sobre la morfología y el pH lisosomal. Sin embargo, se observaron efectos similares cuando las células se trataron con el vehículo en el que se encuentra disuelta la Nec1, el DMSO (0.07  $\mu$ M)

En el caso de la abundancia de cada uno de los grupos lisosomales (Fig. 17c-d), al inhibir la fosforilación de MLKL mediada por RIPK1 con el tratamiento con Nec1 se observó que a lo largo del tiempo en cultivo: a) los lisosomas circulares predominaron en número respecto a los de baja circularidad y los agrandados; b) los lisosomas de baja circularidad aumentaron al día 13 *in vitro*, lo cual no se mantuvo a lo largo del tiempo en cultivo como ocurre en las células control; c) los lisosomas agrandados disminuyeron respecto a los controles.

En cuanto al pH lisosomal (Fig. 18 a, b,c ), la Nec1 y el DMSO tuvieron los siguientes efectos: a) el pH de los lisosomas circulares no cambió a los días 13 y 20 *in vitro*, mientras que en neuronas senescentes, a los 26 D/V, promovieron una disminución en la acidez; .b) los lisosomas de baja circularidad disminuyeron su acidez; c) el pH de los lisosomas agrandados se recuperó, es decir, no disminuyó como en los controles, sino que aumentó y se mantuvo en niveles óptimos para el funcionamiento de las enzimas lisosomales.

El efecto observado por el DMSO podría ser también a través de inhibir también a RIPK1. Las especies reactivas de oxígeno funcionan como un activador de la vía RIPK1-RIPK3-MLKL, la cinasa RIPK1 tiene tres cisteínas que le permiten sentir estas especies y activar su autofosforilación en la serina 161, lo cual permite reclutar a RIPK3 para su activación (Zhang et al., 2017). El DMSO, al ejercer su función antioxidante, podría disminuir esta activación, funcionando como un regulador negativo de la fosforilación de MLKL.

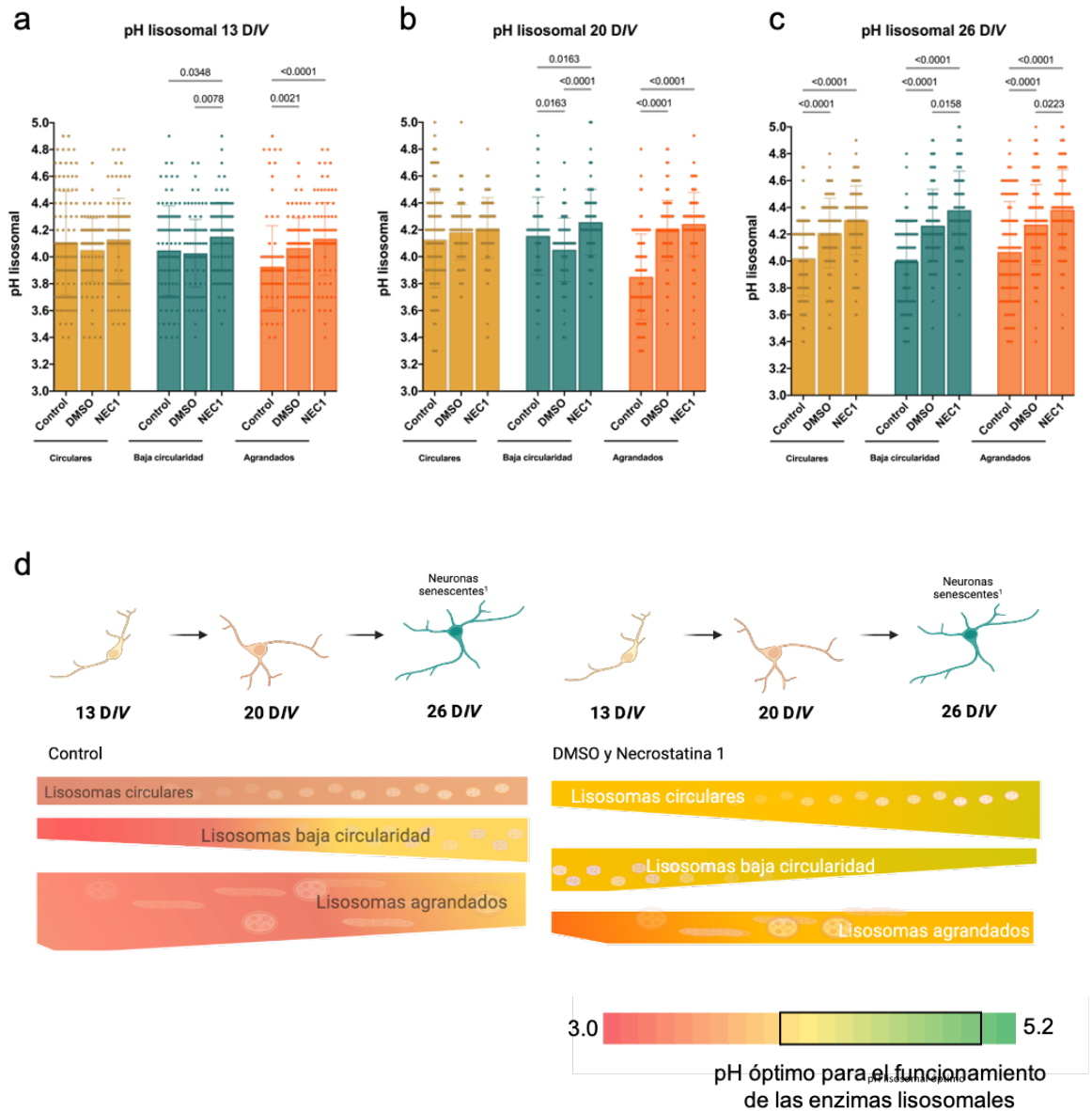
En conjunto estos datos indican que al inhibir la fosforilación de MLKL vía RIPK1 previo al establecimiento del fenotipo senescente evita que se dé un incremento de lisosomas agrandados y que los pocos que existan mantengan un pH funcional (Fig. 18d). La disminución de lisosomas agrandados en neuronas senescentes es compensada con lisosomas circulares, los cuales mantuvieron un pH funcional durante todo el tiempo en cultivo.



**Figura 17. Inhibir la activación de la vía RIPK1-RIPK3-MLKL al día 6 de cultivo disminuyó la formación de lisosomas agrandados.**

a) Esquema de tratamiento con Nec1 b) Los lisosomas fueron teñidos con AzteclLyso<sup>PH</sup> y los núcleos con Hoechst. Los paneles grandes corresponden al empalme, los cuadros pequeños superiores corresponden a la señal de emisión del AzteclLyso<sup>PH</sup> protonado (lisosomas ácidos) y los inferiores a la emisión de la forma desprotonada del AzteclLyso<sup>PH</sup> (lisosomas de baja acidez). La barra de escala representa 25  $\mu$ m. c) Efecto de la Nec1 y el DMSO sobre la distribución de las poblaciones lisosomales en el soma. Se cuantificaron 100 células por condición provenientes de tres experimentos independientes. d) Resumen gráfico del efecto de la Nec1 y el DMSO sobre la población de los tres tipos lisosomales. El ancho de la barra representa la abundancia de ese tipo lisosomal en el soma.



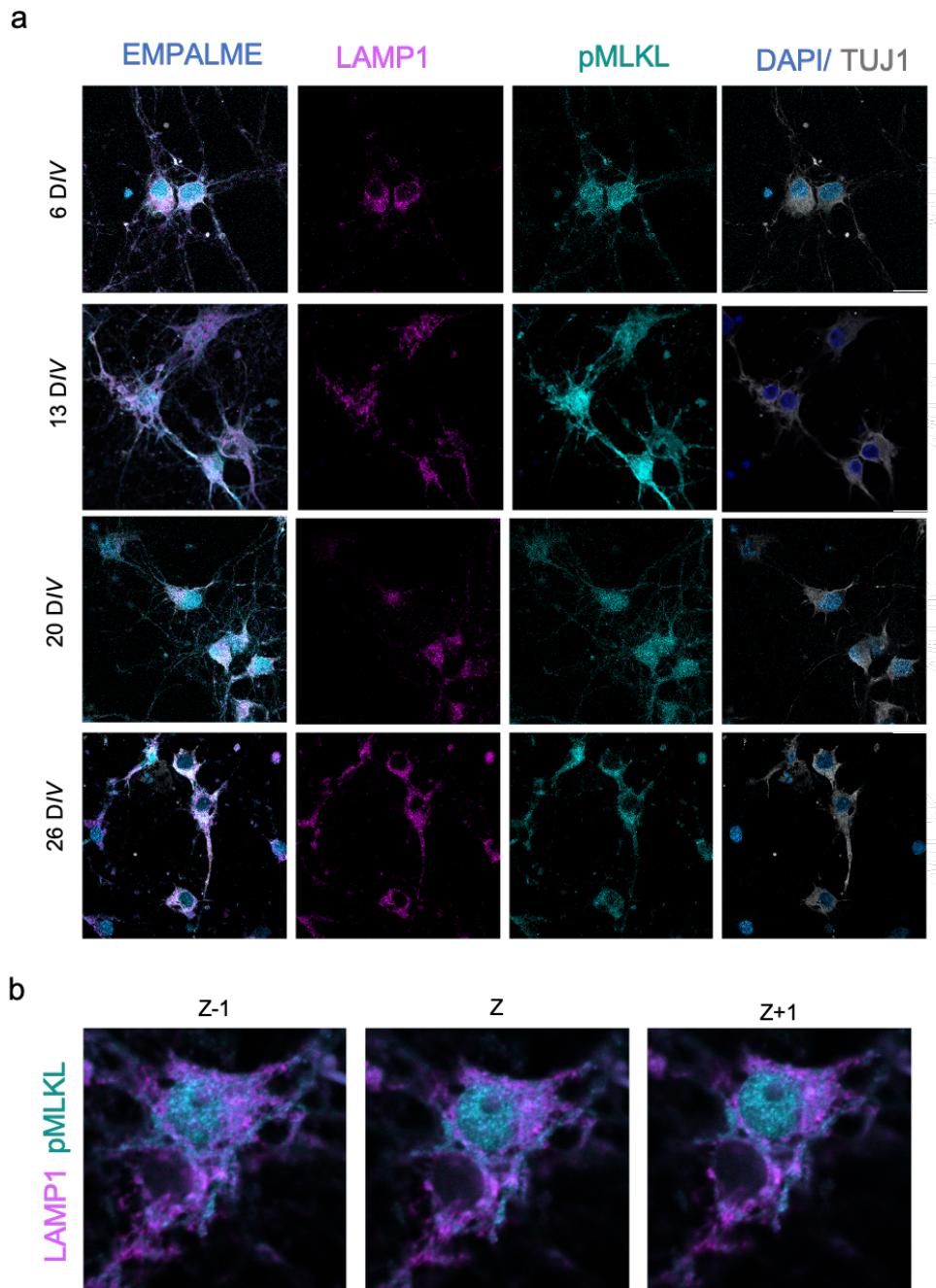


**Figura 18. La administración de Nec1 y DMSO al día 6 *in vitro* evita que los lisosomas incrementen su acidez.**

**a-c)** pH calculado de lisosomas de neuronas 13 D/IV , 20 D/IV y 26 D/IV respectivamente tratadas con necrostatina. Se cuantificaron 100 células por condición provenientes de tres experimentos independientes. Las barras representan la desviación estándar y los números los valores calculados para p calculado mediante una prueba ANOVA de dos vías como prueba estadística seguida de una prueba Tukey. **d)** Resumen gráfico de los cambios en abundancia y pH de cada tipo lisosomal a lo largo del tiempo en cultivo con y sin tratamiento con necrostatina. El ancho de la barra representa la abundancia de ese tipo lisosomal en el soma y el color fue asignado de acuerdo al pH donde el 3.0 es rojo y el 5.0 verde.

#### 10.4 pMLKL se distribuye en la cercanía de los lisosomas agrandados

Para identificar si es que MLKL ejerce su papel sobre el pH lisosomal directamente en los lisosomas, se evaluó su localización subcelular en neuronas corticales durante el establecimiento del fenotipo senescente (Fig. 19a).



**Figura 19. En las neuronas, pMLKL se distribuye cerca de los lisosomas agrandados.**

**a)** Imágenes representativas de las obtenidas en el microscopio confocal; en magenta se muestran los lisosomas (LAMP1), en turquesa pMLKL y en gris la señal de TUJ1, proteína específica de neuronas. Imágenes representativas de tres experimentos independientes. Las barras de escala representan 25  $\mu$ m. **b)** Imagen representativa de una neurona con 13 D/V donde

se observa la distribución de pMLKL alrededor de los lisosomas agrandados. Separación entre los planos 0.36 $\mu$ m

Respecto al tiempo en cultivo, la distribución de pMLKL pasó de ser nuclear en células jóvenes a citoplásmica en neuronas senescentes. La abundancia de pMLKL en el citoplasma hace que sea difícil distinguir si se acumula sobre los lisosomas agrandados directamente o si interactúa con ellos de otra manera (Fig. 19b). Lo que sí se puede observar es que los focos de MLKL se encuentran cerca de los lisosomas agrandados. Sin embargo, hacen falta más experimentos para concluir el tipo de interacción que existe entre ellos.

## 11 Discusión

Abundantes observaciones muestran que la acumulación de células senescentes contribuye al envejecimiento y a la patología de diversas enfermedades. Con el envejecimiento también se acumulan células cerebrales senescentes, incluidas las neuronas, y en estudios previos observamos que resultan de una pérdida del flujo autofágico. Es necesario, ahora, entender qué cambios ocurren en las neuronas que llevan a la disfunción de la autofagia. Trabajos previos muestran que los lisosomas en las células senescentes adquieren una morfología tubular, sin embargo, no se había descrito si son causa o consecuencia del fenotipo senescente.

En este trabajo investigamos en qué momento del establecimiento del fenotipo senescente es que comienzan a aparecer los lisosomas tubulares, agrandados, y si mantienen su funcionalidad. Descubrimos que los lisosomas agrandados y tubulares, con un pH menor al funcional, son detectables en las neuronas corticales a partir de los 13 días en cultivo, lo que corresponde en temporalidad previo al establecimiento del fenotipo senescente (Moreno-blas et al., 2019). Podemos concluir que los lisosomas amorfos y disfuncionales no son consecuencia de la senescencia, dado que a los 13 días de cultivo aún no aparecen características de ella. Por lo tanto, la formación de lisosomas amorfos podría contribuir a los cambios que llevan a la senescencia neuronal.

El aumento de lisosomas agrandados coincide temporalmente con la degeneración de los microtúbulos. Considerando que los lisosomas son transportados a lo largo de los microtúbulos para ser distribuidos en la célula; la fragmentación de los microtúbulos podría provocar acumulación de lisosomas en el soma que al no poder ser transportados, sufren modificaciones en su morfología. Dada su proximidad por la acumulación, podría favorecerse la fusión de lisosomas dando lugar a los lisosomas agrandados. El aumento en la abundancia de los lisosomas de circularidad baja observados a los días 20 y 26 *in vitro* podrían tener como origen la fisión de lisosomas agrandados. Poco se ha descrito acerca de la fisión y fusión lisosomal, sin embargo, previamente se ha publicado que los lisosomas se fusionan por periodos cortos para intercambiar su contenido y se fisian para formar vesículas empleando proteínas como clatrin y kinesinas para guiar la formación de la vesícula y su corte

posterior (Saffi et al., 2019). Pensamos que los lisosomas tienen una dinámica de fusión-fisión esencial para sus funciones celulares, equivalente a la dinámica mitocondrial, que en el envejecimiento podría atrofiarse.

Los lisosomas agrandados y de baja circularidad podrían no fusionarse con los autofagosomas debido a cambios en su morfología y pH, lo que contribuiría a la atrofia de la autofagia. Experimentos con cloroquina, que favorece la alcalinización lisosomal, muestran que cuando el pH de los lisosomas es básico, no se puede fusionar con los autofagosomas (Mauthe et al., 2018). El pH extremadamente ácido o básico podría ser incompatible con la maquinaria molecular de la fusión, y la morfología alterada podría modificar el arreglo de proteínas necesario para la unión de motores moleculares o impedir la unión de proteínas necesarias para la fusión con el autofagosoma.

Los cambios en pH lisosomal documentados describen en general una basificación del lumen lisosomal (Porter et al., 2013), por lo que esperábamos que el pH de los lisosomas amorfos tuvieran un pH más básico. Sin embargo, obtuvimos evidencia de que ocurren cambios en el pH que aumentan su acidez, llegando a valores menores a 4. Si bien está ampliamente documentado que las enzimas lisosomas pierden su actividad a pH básico, hay un estudio en el que analizaron la actividad enzimática en un rango amplio de pH y descubrieron que bajando de pH 4 disminuye la maduración de las catepsinas (Tang et al., 2021). Esto sugiere que hay un umbral óptimo de pH para la funcionalidad de los lisosomas, por lo que proponemos que los lisosomas amorfos hiperacidificados que se forman durante la geroconversión no son funcionales.

Existen inhibidores farmacológicos de la autofagia, como la bafilomicina A1, la cloroquina y el NH<sub>4</sub>Cl, que previenen la acidificación lisosomal. Experimentos con estos fármacos han evidenciado que, además de modificar el pH lisosomal, estos agentes promueven un enriquecimiento significativo del colesterol en la membrana lisosomal (Furuchi et al., 1993; Maharjan et al., 2022). Por lo cual mantener el pH óptimo del lisosoma podría ser crucial para el flujo de colesterol a otros compartimentos celulares, y que la hiperacidificación o hiperbasificación del lumen de este organelo podría resultar en cambios en su composición lipídica. El mecanismo detrás de la relación entre la acumulación de colesterol lisosomal y la acidificación lisosomal todavía no se entiende. Sin embargo, la acumulación de colesterol lisosomal podría afectar el anclaje de proteínas de fusión de membrana, tales como VAMPs o syntaxinas, que se requieren para la fusión autophagosoma-lisosoma y promover así la acumulación de autofagosomas maduros observada en las células senescentes. La acumulación de colesterol en las membranas lisosomales también puede explicar los cambios en la morfología observados ya que este lípido produce curvaturas irregulares en las membranas lipídicas (Yesylevskyy et al., 2013) como las observadas en los lisosomas de baja circularidad.

Proponemos que la pMLKL podría alterar la morfología y el pH lisosomal, ya que observamos que la inhibición de la vía RIPK1-RIPK3-MLKL evita los cambios observados en morfología y pH lisosomal, particularmente la de los lisosomas agrandados. En células COS1 se demostró que la proteína lisosomal TMEM175 regula el equilibrio de protones dentro y fuera del lisosoma al funcionar como intercambiador de iones y sensor del potencial de membrana lisosomal. Evitar su función genera un incremento en el pH, tamaño lisosomal y una acumulación perinuclear de los lisosomas (Yang et al., 2023) similar a la que observamos en las neuronas senescentes. Considerando que en cultivos neuronales de 13 D/V pMLKL sale del núcleo y se localiza en regiones citoplásmicas donde también se observan lisosomas amorfos, proponemos que pMLKL podría estar interactuando con este canal favoreciendo la acumulación de protones en el interior de los lisosomas, predominantemente previo al establecimiento de la senescencia.

Para corroborar la participación de pMLKL se podría inhibir su expresión y analizar si los lisosomas se mantienen saludables. En apoyo a esta propuesta está la observación de que en cerebros de ratones viejos que no expresan MLKL hay menos células cerebrales senescentes (Arrázola et al., 2023). Para probar lo anterior, sería necesario determinar el origen de los lisosomas de baja circularidad en cada una de las ventanas temporales, así como promover la fragmentación axonal farmacológicamente a los 6 D/V para establecer si la dinámica lisosomal observada es consecuencia de la baja movilidad de los lisosomas disponibles en la célula. También se deberían caracterizar las proteínas de membrana presentes en cada uno de los tipos lisosomales.

Considerando que los lisosomas participan en funciones diversas y no solo en la autofagia, resulta interesante que exista a lo largo del cultivo un porcentaje constante de lisosomas circulares, pequeños y con pH cercano a 4.4 que podrían estar participando en actividades vitales para la célula como el monitoreo de nutrientes y la señalización celular. En este mismo sentido, vale la pena considerar que diversas enfermedades se desarrollan cuando los lisosomas no funcionan correctamente, en las llamadas enfermedades lisosomales (Parenti et al; 2021). Los resultados obtenidos con este trabajo tienen un impacto potencial en la biomedicina, ya que nuestro modelo de senescencia neuronal puede también ser un modelo para estudiar el mecanismo molecular por el cual los lisosomas amorfos se forman, como se desregula el control del pH que permite tenerlo más ácido de 4.0, pudiendo contribuir al entendimiento de las enfermedades lisosomales.

## 12 Conclusión

En este trabajo se caracterizaron los cambios en la morfología y pH lisosomal de un modelo de senescencia neuronal in vitro. Lo que permitió establecer que la hiperacidificación de este organelo y la aparición de lisosomas polimórficos preceden la geroconversión. Estos cambios están asociados con la activación de la vía RIPK1/RIPK3/MLKL. Al inhibir esta vía, es posible reducir el número de lisosomas polimórficos y restaurar el pH óptimo necesario en su interior para el correcto funcionamiento de las hidrolasas lisosomales.

## 13 Perspectivas

- Corroborar la participación de pMLKL, inhibiendo su expresión, en la formación y acidez de lisosomas amorfos.
- Estudiar mediante microscopía electrónica si la forma fosforilada de MLKL se acumula en la membrana de lisosomas polimórficos.
- Estudiar si MLKL interacciona físicamente con TMEM175.
- Evaluar si existen cambios en la composición lipídica de las membranas de los lisosomas polimórficos

## 14 Anexos

### 14.1 Materiales y reactivos

Tabla 2. Reactivos y materiales empleados para la realización de esta tesis

	Reactivo/ Material	Marca	Número de catálogo	Concentración de trabajo
Cultivo celular	Ratas Wistar (WI)	Charles River Raleigh		
	Medio Neurobasal	Gibco	21103049	
	Gentamicina (50 mg/ml)	Gibco	15750060	
	Suplemento B-27 (50x), sin suero	Gibco	17504044	
	Caja de 12 pozos	Corning	CLS3513-50EA	
	Cubreobjetos redondo	Paul Marienfeld	111580	
	Jeringa 20 mL	BD Plastipak	302562	
	Filtro con diámetro de 25 mm y poro de 0.2 $\mu$ M	Corning	431224	
	Hojas de bisturí número 21	Braun		
	Cajas con fondo de vidrio de 15 mm	Nest	801002	
	Desoxirribonucleasa I de pancreas bovino	Sigma Aldrich	D5025-375KU	
	Tripsina-EDTA 0.5%	Gibco	15400054	
	Inhibidor de tripsina	Gibco	17075029	
	Glutamax	Gibco	A1286001	
	Poli-L-lisina	Sigma Aldrich	P1524	0.1 mg/mL en agua estéril
	Cloruro de sodio	J.T. Baker	304001	
	Cloruro de potasio	Sigma Aldrich	P9541	
	Fosfato de monopatosis	Sigma Aldrich	P9791-100G	
	Rojo fenol	Sigma Aldrich	P5530	
	Sulfato de magnesio	J.T. Baker	2500-01	
Suero fetal bovino	Invitrogen	16000-044		
Necrostatina 1	Sigma Aldrich	N9037	100 $\mu$ M en medio neurobasal completo	
Morfología y pH lisosomal	Dimetilsulfóxido	Sigma Aldrich	D2438-50ML	0.07 $\mu$ M en medio neurobasal completo
	Lysotracker Red DND 90	Invitrogen	L7528	70nM en medio neurobasal completo
	Hoechst 33258	Enzo	ENZ-52402	0.2 $\mu$ g/mL en medio neurobasal completo
	AzteclysoPH	Sintetizado y donado por el grupo del Dr. Arturo Jiménez del Instituto de Química, UNAM		40nM en medio neurobasal completo
Inmunofluorescencia	Lysosensor yellow/blue	Invitrogen	L7545	10nM en medio neurobasal completo
	Portaobjetos esmerilados 25x75 mm	Madesa		
	anti $\beta$ -Tubulina clase III	Abcam	ab41489	1:200 en PBS/ Tween 0.1% /Tritón 0.25%
	anti LAMP1	Abcam	ab25630	1:150 en PBS/ Tween 0.1% /Tritón 0.25%
	anti MLKL fosforilada en la serina 345	Abcam	ab196496	1:500 en PBS/ Tween 0.1% /Tritón 0.25%
	anti-MLKL	Invitrogen	PA5101810	1:500 en PBS/ Tween 0.1% /Tritón 0.25%
	Alexa 488 Fluor anti-ratón	Invitrogen	A11029	1:500 en PBS/ Tween 0.1% /Tritón 0.25%
	Alexa 594 Fluor anti-conejo	Invitrogen	A11037	1:500 en PBS/ Tween 0.1% /Tritón 0.25%
	Alexa 647 Fluor anti-pollo	Abcam	ab150175	1:500 en PBS/ Tween 0.1% /Tritón 0.25%
	Trton X-100	Sigma Aldrich	T8532-100ML	
	TWEEN 20	Sigma Aldrich	P2287-100ML	
DAPI	Sigma Aldrich	D1306	1 $\mu$ g/ mL en PBS 1X	

## 14.2 Componentes del medio Neurobasal complementado

Tabla 3. Componentes del medio Neurobasal complementado para realizar el cultivo primario de neuronas corticales

Reactivo	Volumen (mL)	Concentración final
Medio Neurobasal	c.b.p. 50 mL	
Gentamicina (50 mg/ml)	0.200	0.2 mg/mL
Suplemento B-27 (50X), sin suero	1.000	1.0 X
Glutamax (100 X)	0.075	0.2 X

## 14.3 Cultivo primario de neuronas corticales

0. Un día antes: Preparar las soluciones en esterilidad, ponerle PLL a las cajas y asegurarse de tener todo el material necesario estéril.

Tabla 4. Soluciones necesarias para el cultivo primario de neuronas corticales de rata

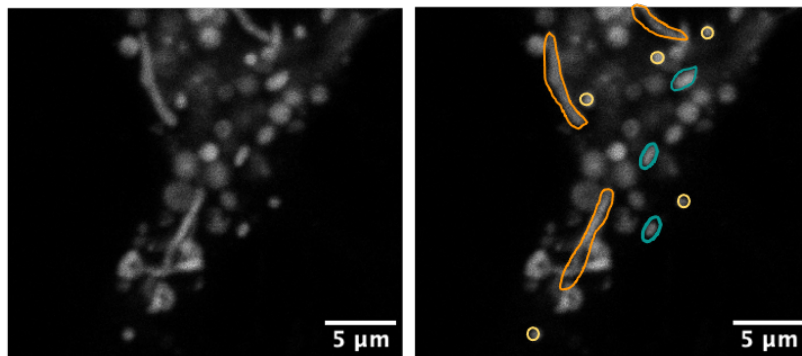
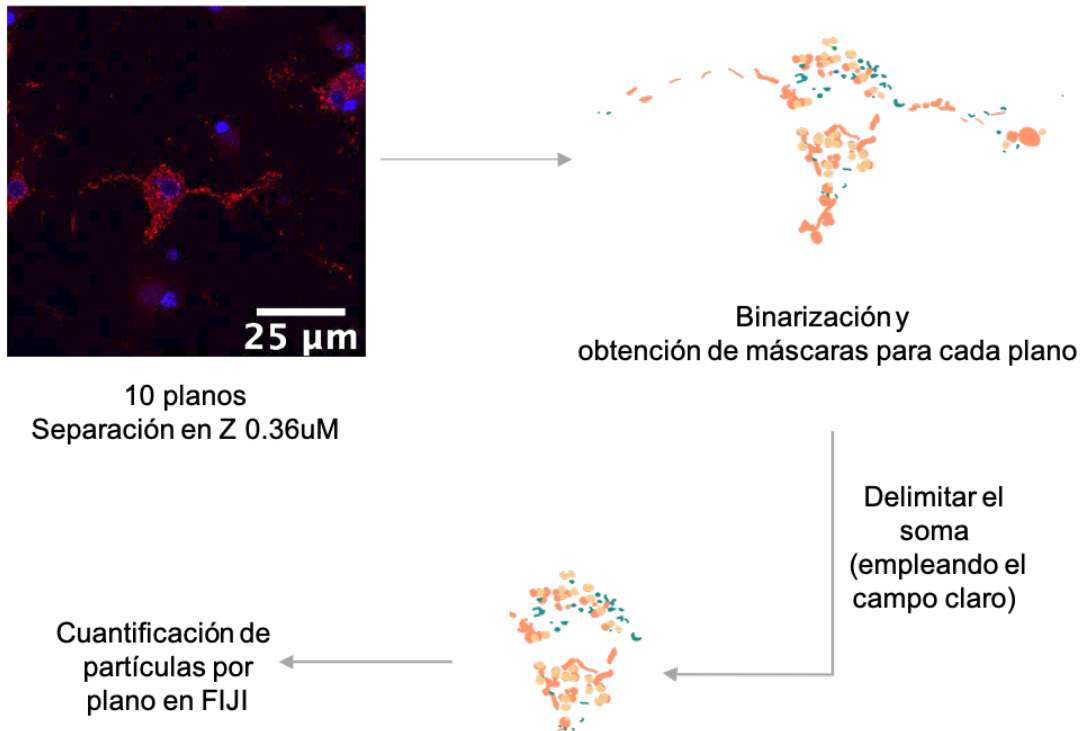
Solución 1		
Componente	Concentración	Cantidad
KRB (Amortiguador Krebs-Ringer)	1X	100 mL
BSA	-	0.3 g
MgSO <sub>4</sub>	3.8%	800 uL
Solución 2		
Solución 1	-	10 mL
Tripsina EDTA	10 X	1 uL por embrión
Solución 3		
Solución 1	-	10 mL
DNAsa	-	0.8 mg
SBT	-	5.2 mg
MgSO <sub>4</sub>	3.8%	100 uL
Solución 4		
Solución 1	-	10.5 mL
Solución 3	-	2.0 mL
Solución 5		
Solución 1	-	
CaCl <sub>2</sub>	1.2%	15 uL
MgSO <sub>4</sub>	3.8%	100 uL






1. Colocar las soluciones a temperatura ambiente.
  2. En la campana antes de extraer los fetos
    - a. Filtrar la solución 1
    - b. Colocar 10 ml de la solución 1 en un tubo de 15 ml
    - c. Poner 6 ml de la solución 1 en dos cajas de Petri y 8ml en otras dos (usar tapa y base)
  3. Llevar una de las tapas de la solución 1 a donde se extraerán los embriones
  4. Sacar la guillotina y poner periódico en la cama de la rata
  5. Sacrificio
  6. Limpiar el vientre con alcohol y abrir con tijeras
  7. Sacar a los cuernos uterinos, pasarlos por agua destilada estéril o PBS 1X estéril para quitar pelo y sangre y colocarlos en la caja con solución 1 para llevarlos a la campana.
  8. Limpiar el material usado para el sacrificio
  9. En la campana extraer las cortezas
    - a. Sacar a los embriones de las deciduas y pasarlos a otra caja
    - b. Cortar las cabezas entre los ojos y la nariz
- En microscopio: Quitar las meninges y disecar las cortezas colocándolas en otra caja
10. Retirar el exceso de medio de la caja y dejar las cortezas húmedas. Cortar en trozos muy pequeños las cortezas con un bisturí nuevo.
  11. Transferir el tejido al tubo de 15 ml con 10 ml de la solución 1 (2a) con ayuda de una pipeta Pasteur
  12. Centrifugar a 2500 rpm 3 minutos
  13. Decantar el sobrenadante con cuidado de no dejar nunca seca la pastilla
  14. Agregar 7ml de la solución 2 filtrada más tripsina (1uL por embrión) . Agitar vigorosamente hasta deshacer el pellet
  15. Dejar incubar la tripsina 3 a 5 minutos. Agitar por inmersión cada minuto para evitar que se vuelva a formar el pellet.

16. Agregar 7 ml de la solución 4 y agitar por inmersión
17. Centrifugar a 2500 rpm por 3 minutos
18. Preparar otro tubo de 15 ml con 5 ml de la solución 5
19. Decantar sobrenadante sin dejar seca la pastilla
20. Agregar 5 ml de la solución 3
21. Disgregar con pipeta Pasteur 100 a 200 veces
22. Pasar en dos partes las células al filtro con malla
23. Disgregar 30 a 60 veces pegando la pipeta a la malla sin hacer mucha presión
24. Transferir las células disgregadas al tubo con sol. 5
25. Centrifugar a 2500 rpm por 3 minutos
26. Retirar sobrenadante y agregar medio
27. Disgregar el pellet y contar las células obtenidas
28. Sembrar a 200 mil células/mL.

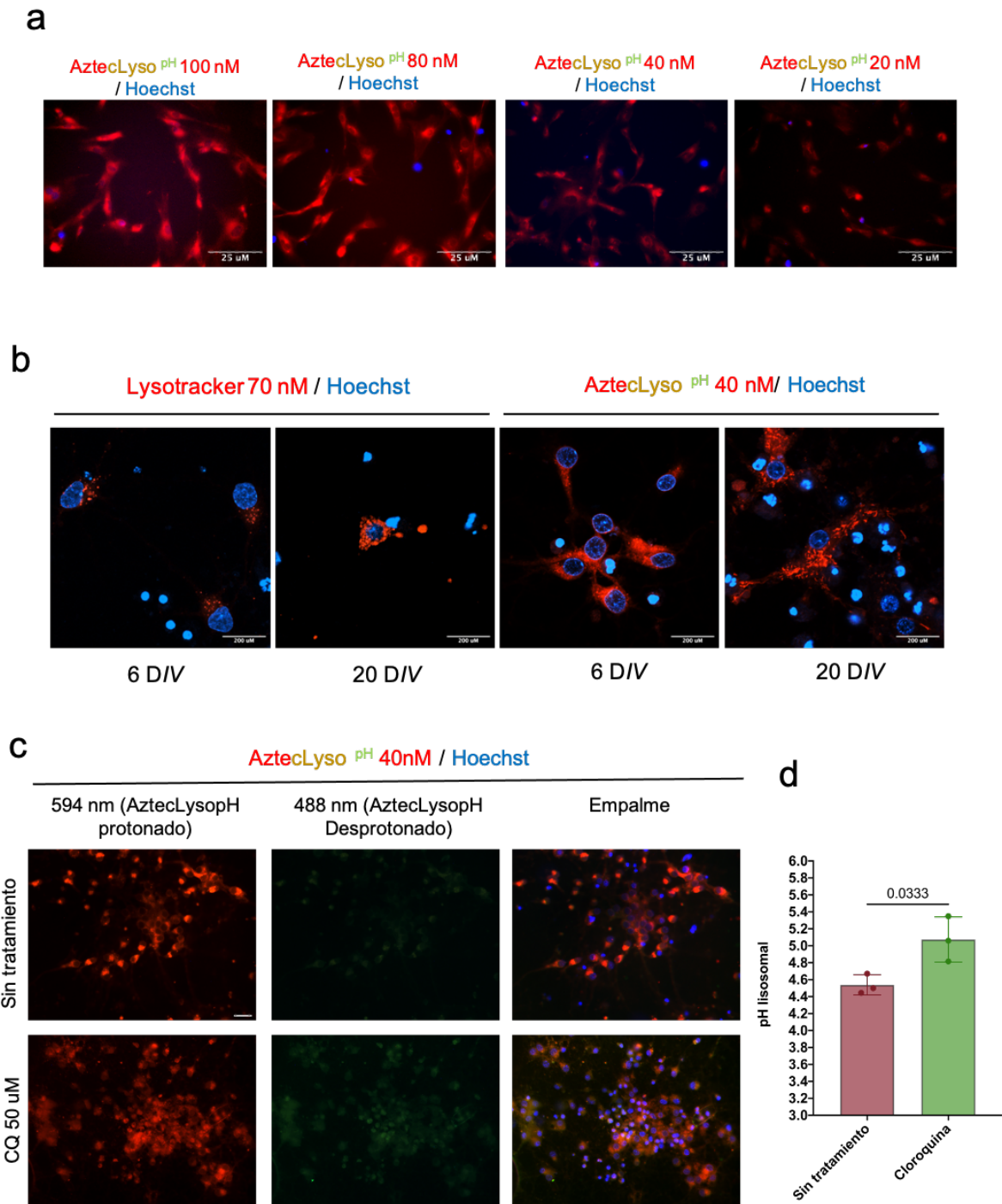
#### 14.4 Obtención de imágenes de lisosomas teñidos con LysoTracker y procesamiento



Área (μm <sup>2</sup> )	Circularidad	Clasificación otorgada
0.1-10	0.0-0.6	 Lisosomas de baja circularidad
0.1-10	0.6-1.0	 Lisosomas circulares
10-100	0.0-1.0	 Lisosomas agrandados

→ Promedio de los 10 planos

## 14.5 Estandarización AztecLyso<sup>pH</sup> en cultivo primario de neuronas corticales de rata



a) Imágenes representativas de las obtenidas en el microscopio de epifluorescencia; en rojo se muestran los lisosomas (AztecLyso<sup>pH</sup>) a distintas concentraciones de trabajo. b) Imágenes representativas de una neurona con 6 y 20 DIV donde la tinción con AztecLyso<sup>pH</sup> permite observar las morfologías lisosomales establecidas usando el Lysotracker. c) Validación de los cambios en la fluorescencia del AztecLyso<sup>pH</sup> en respuesta a cambios en el pH lisosomal. Imágenes representativas de 3 experimentos independientes. Los números corresponden al valor de p calculado mediante una prueba estadística t student.

## 15 Bibliografía

- Abate, M., Festa, A., Falco, M., Lombardi, A., Luce, A., Grimaldi, A., Zappavigna, S., Sperlongano, P., Irace, C., Caraglia, M., & Misso, G. (2020). Mitochondria as playmakers of apoptosis, autophagy and senescence. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 98(March 2019), 139–153. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.05.022>
- Arrázola, M. S., Lira, M., Véliz-Valverde, F., Quiroz, G., Iqbal, S., Eaton, S. L., Lamont, D. J., Huerta, H., Ureta, G., Bernales, S., Cárdenas, J. C., Cerpa, W., Wishart, T. M., & Court, F. A. (2023). Necroptosis inhibition counteracts neurodegeneration, memory decline, and key hallmarks of aging, promoting brain rejuvenation. *Aging Cell*, 22(5). <https://doi.org/10.1111/accel.13814>
- Arrázola, M. S., Saquel, C., Catalán, R. J., Barrientos, S. A., Hernandez, D. E., Martínez, N. W., Catenaccio, A., & Court, F. A. (2019). Axonal degeneration is mediated by necroptosis activation. *Journal of Neuroscience*, 39(20), 3832–3844. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0881-18.2019>
- Bandyopadhyay, D., Cyphersmith, A., Zapata, J. A., Kim, Y. J., & Payne, C. K. (2014). Lysosome transport as a function of lysosome diameter. *PLoS ONE*, 9(1), 18–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086847>
- Bouhamdani, N., Comeau, D., & Turcotte, S. (2021a). A Compendium of Information on the Lysosome. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.798262>
- Bouhamdani, N., Comeau, D., & Turcotte, S. (2021b). A Compendium of Information on the Lysosome. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.798262>
- Campisi, J., & D'Adda Di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: When bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(9), 729–740. <https://doi.org/10.1038/nrm2233>
- Chaib, S., Tchkonja, T., & Kirkland, J. L. (2022). Cellular senescence and senolytics: the path to the clinic. *Nature Medicine*, 28(8), 1556–1568. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01923-y>
- Chen, Y., & Yu, L. (2017). Recent progress in autophagic lysosome reformation. In *Traffic* (Vol. 18, Issue 6, pp. 358–361). Blackwell Munksgaard. <https://doi.org/10.1111/tra.12484>
- de Araujo, M. E. G., Liebscher, G., Hess, M. W., & Huber, L. A. (2020). Lysosomal size matters. *Traffic*, 21(1), 60–75. <https://doi.org/10.1111/tra.12714>
- Degterev, A., Hitomi, J., Gemscheid, M., Ch'en, I. L., Korkina, O., Teng, X., Abbott, D., Cuny, G. D., Yuan, C., Wagner, G., Hedrick, S. M., Gerber, S. A., Lugovskoy, A., & Yuan, J. (2008). Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nature Chemical Biology*, 4(5), 313–321. <https://doi.org/10.1038/nchembio.83>
- di Micco, R., Krizhanovsky, V., Baker, D., & d'Adda di Fagagna, F. (2021). Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22(2), 75–95. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00314-w>
- Dong, X. P., Shen, D., Wang, X., Dawson, T., Li, X., Zhang, Q., Cheng, X., Zhang, Y., Weisman, L. S., Delling, M., & Xu, H. (2010). PI(3,5)P2 controls membrane trafficking by direct activation of mucolipin Ca<sup>2+</sup> release channels in the endolysosome. *Nature Communications*, 1(4). <https://doi.org/10.1038/ncomms1037>

- Eskelinen, E.-L., Tanaka, Y., & Saftig, P. (2003). At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends in Cell Biology*, 13(3), 137–145. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(03\)00005-9](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(03)00005-9)
- Feng, Y., He, D., Yao, Z., & Klionsky, D. J. (2014). The machinery of macroautophagy. *Cell Research*, 24(1), 24–41. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.168>
- Fleming, A., & Rubinsztein, D. C. (2020). Autophagy in Neuronal Development and Plasticity. *Trends in Neurosciences*, 43(10), 767–779. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.07.003>
- Flores-Romero, H., Ros, U., & Garcia-Saez, A. J. (2020). Pore formation in regulated cell death. *The EMBO Journal*, 39(23), 1–18. <https://doi.org/10.15252/embj.2020105753>
- Frese, M. A., Schulz, S., & Dierks, T. (2008). Arylsulfatase G, a novel lysosomal sulfatase. *Journal of Biological Chemistry*, 283(17), 11388–11395. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709917200>
- Furuchi, T., Aikawa, K., Arai, H., & Inoue, K. (1993). Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase, blocks lysosomal cholesterol trafficking in macrophages. *The Journal of biological chemistry*, 268(36), 27345–27348.
- Galluzzi, L., Baehrecke, E. H., Ballabio, A., Boya, P., Bravo-San Pedro, J. M., Cecconi, F., Choi, A. M., Chu, C. T., Codogno, P., Colombo, M. I., Cuervo, A. M., Debnath, J., Deretic, V., Dikic, I., Eskelinen, E., Fimia, G. M., Fulda, S., Gewirtz, D. A., Green, D. R., ... Kroemer, G. (2017a). Molecular definitions of autophagy and related processes. *The EMBO Journal*, 36(13), 1811–1836. <https://doi.org/10.15252/embj.201796697>
- Galluzzi, L., Baehrecke, E. H., Ballabio, A., Boya, P., Bravo-San Pedro, J. M., Cecconi, F., Choi, A. M., Chu, C. T., Codogno, P., Colombo, M. I., Cuervo, A. M., Debnath, J., Deretic, V., Dikic, I., Eskelinen, E., Fimia, G. M., Fulda, S., Gewirtz, D. A., Green, D. R., ... Kroemer, G. (2017b). Molecular definitions of autophagy and related processes. *The EMBO Journal*, 36(13), 1811–1836. <https://doi.org/10.15252/embj.201796697>
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D. W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A. v., Arama, E., Baehrecke, E. H., Barlev, N. A., Bazan, N. G., Bernassola, F., Bertrand, M. J. M., Bianchi, K., ... Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death and Differentiation*, 25(3), 486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>
- Gonzalez, C. D., Resnik, R., & Vaccaro, M. I. (2020). Secretory Autophagy and Its Relevance in Metabolic and Degenerative Disease. *Frontiers in Endocrinology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00266>
- Gorgoulis, V., Adams, P. D., Alimonti, A., Bennett, D. C., Bischof, O., Bishop, C., Campisi, J., Collado, M., Evangelou, K., Ferbeyre, G., Gil, J., Hara, E., Krizhanovskiy, V., Jurk, D., Maier, A. B., Narita, M., Niedernhofer, L., Passos, J. F., Robbins, P. D., ... Demaria, M. (2019). Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell*, 179(4), 813–827. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.005>
- Gorostieta-Salas, E., Moreno-Blas, D., Gerónimo-Olvera, C., Cisneros, B., Court, F. A., & Castro-Obregón, S. (2021). Enhanced Activity of Exportin-1/CRM1 in Neurons Contributes to Autophagy Dysfunction and Senescent Features in Old Mouse Brain. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 1–22. <https://doi.org/10.1155/2021/6682336>
- Gorostieta-Salas, E., Moreno-Blas, D., Geronimo-Olvera, C., Cisneros, B., Court, F. A., & Castro-Obregon, S. (2021). Enhanced Activity of Exportin-1/CRM1 in

- Neurons Contributes to Autophagy Dysfunction and Senescent Features in Old Mouse Brain. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/6682336>
- Grootjans, S., vanden Berghe, T., & Vandenabeele, P. (2017). Initiation and execution mechanisms of necroptosis: An overview. *Cell Death and Differentiation*, 24(7), 1184–1195. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.65>
- Hansen, M., Rubinsztein, D. C., & Walker, D. W. (2018a). Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(9), 579–593. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0033-y>
- Hansen, M., Rubinsztein, D. C., & Walker, D. W. (2018b). Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(9), 579–593. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0033-y>
- Hayflick, L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 37(3), 614–636. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(65\)90211-9](https://doi.org/10.1016/0014-4827(65)90211-9)
- Isacson, O. (1993). On neuronal health. *Trends in Neurosciences*, 16(8), 306–308. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(93\)90104-T](https://doi.org/10.1016/0166-2236(93)90104-T)
- Johnson, D. E., Ostrowski, P., Jaumouillé, V., & Grinstein, S. (2016). The position of lysosomes within the cell determines their luminal pH. *Journal of Cell Biology*, 212(6), 677–692. <https://doi.org/10.1083/jcb.201507112>
- Kitada, M., & Koya, D. (2021). Autophagy in metabolic disease and ageing. *Nature Reviews Endocrinology*, 0123456789. <https://doi.org/10.1038/s41574-021-00551-9>
- Kuijpers, M., Azarnia Tehran, D., Haucke, V., & Soykan, T. (2021). The axonal endolysosomal and autophagic systems. *Journal of Neurochemistry*, 158(3), 589–602. <https://doi.org/10.1111/jnc.15287>
- Kulkarni, A., Chen, J., & Maday, S. (2018). Neuronal autophagy and intercellular regulation of homeostasis in the brain. *Current Opinion in Neurobiology*, 51, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.02.008>
- Lee, J. H., Yu, W. H., Kumar, A., Lee, S., Mohan, P. S., Peterhoff, C. M., Wolfe, D. M., Martinez-Vicente, M., Massey, A. C., Sovak, G., Uchiyama, Y., Westaway, D., Cuervo, A. M., & Nixon, R. A. (2010). Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell*, 141(7), 1146–1158. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.05.008>
- Lehner, R., & Quiroga, A. D. (2016). Fatty Acid Handling in Mammalian Cells. In *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes: Sixth Edition* (pp. 149–184). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63438-2.00005-5>
- Leidal, A. M., Levine, B., & Debnath, J. (2018). Autophagy and the cell biology of age-related disease. *Nature Cell Biology*, 20(12), 1338–1348. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0235-8>
- Lieberman, O. J., & Sulzer, D. (2020). The Synaptic Autophagy Cycle. *Journal of Molecular Biology*, 432(8), 2589–2604. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.12.028>
- Linebaugh, B. E., Sameni, M., Day, N. A., Sloane, B. F., & Keppler, D. (1999). Exocytosis of active cathepsin B: Enzyme activity at pH 7.0, inhibition and molecular mass. *European Journal of Biochemistry*, 264(1), 100–109. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00582.x>
- Maciel-Barón, L. Á., Moreno-Blas, D., Morales-Rosales, S. L., González-Puertos, V. Y., López-Díazguerrero, N. E., Torres, C., Castro-Obregón, S., & Königsberg, M. (2018). Cellular Senescence, Neurological Function, and Redox State. *Antioxidants & Redox Signaling*, 28(18), 1704–1723. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7112>

- Maday, S., Wallace, K. E., & Holzbaur, E. L. F. (2012). Autophagosomes initiate distally and mature during transport toward the cell soma in primary neurons. *Journal of Cell Biology*, *196*(4), 407–417. <https://doi.org/10.1083/jcb.201106120>
- Maharjan, Y., Dutta, R.K., Son, J. et al. Intracellular cholesterol transport inhibition Impairs autophagy flux by decreasing autophagosome–lysosome fusion. *Cell Commun Signal* *20*, 189 (2022). <https://doi.org/10.1186/s12964-022-00942-z>
- Mauthe, M., Orhon, I., Rocchi, C., Zhou, X., Luhr, M., Hijlkema, K. J., Coppes, R. P., Engedal, N., Mari, M., & Reggiori, F. (2018). Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*, *14*(8), 1435–1455. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1474314>
- Menzies, F. M., Fleming, A., Caricasole, A., Bento, C. F., Andrews, S. P., Ashkenazi, A., Füllgrabe, J., Jackson, A., Jimenez Sanchez, M., Karabiyik, C., Licitra, F., Lopez Ramirez, A., Pavel, M., Puri, C., Renna, M., Ricketts, T., Schlotawa, L., Vicinanza, M., Won, H., ... Rubinsztein, D. C. (2017). Autophagy and Neurodegeneration: Pathogenic Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Neuron*, *93*(5), 1015–1034. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.01.022>
- Mindell, J. A. (2012). Lysosomal acidification mechanisms. *Annual Review of Physiology*, *74*(January), 69–86. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-012110-142317>
- Mizushima, N., & Levine, B. (2010). Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nature Cell Biology*, *12*(9), 823–830. <https://doi.org/10.1038/ncb0910-823>
- Moiseeva, O., Mallette, F. A., Mukhopadhyay, U. K., Moores, A., & Ferbeyre, G. (2006). DNA Damage Signaling and p53-dependent Senescence after Prolonged  $\beta$ -Interferon Stimulation. *Molecular Biology of the Cell*, *17*(4), 1583–1592. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-09-0858>
- Mony, V. K., Benjamin, S., & O'Rourke, E. J. (2016). A lysosome-centered view of nutrient homeostasis. *Autophagy*, *12*(4), 619–631. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1147671>
- Moreno-Blas, D., Gorostieta-Salas, E., Pommer-Alba, A., Muciño-Hernández, G., Gerónimo-Olvera, C., Maciel-Barón, L. A., Konigsberg, M., Massieu, L., & Castro-Obregón, S. (2019). Cortical neurons develop a senescence-like phenotype promoted by dysfunctional autophagy. *Aging*, *11*(16), 6175–6198. <https://doi.org/10.18632/aging.102181>
- Nakamura, Y., Takeda, M., Suzuki, H., Morita, H., Tada, K., Hariguchi, S., & Nishimura, T. (1989). Lysosome instability in aged rat brain. *Neuroscience Letters*, *97*(1–2), 215–220. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(89\)90166-3](https://doi.org/10.1016/0304-3940(89)90166-3)
- Narita, M., Young, A. R. J., Arakawa, S., Samarajiwa, S. A., Nakashima, T., Yoshida, S., Hong, S., Berry, L. S., Reichelt, S., Ferreira, M., Tavaré, S., Inoki, K., Shimizu, S., & Narita, M. (2011). Spatial coupling of mTOR and autophagy augments secretory phenotypes. *Science*, *332*(6032), 966–970. <https://doi.org/10.1126/science.1205407>
- Nirschl, J. J., Ghiretti, A. E., & Holzbaur, E. L. F. (2017). The impact of cytoskeletal organization on the local regulation of neuronal transport. *Nature Reviews Neuroscience*, *18*(10), 585–597. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.100>
- Ogrodnik, M., Salmonowicz, H., & Gladyshev, V. N. (2019). Integrating cellular senescence with the concept of damage accumulation in aging: Relevance for clearance of senescent cells. *Aging Cell*, *18*(1), 1–21. <https://doi.org/10.1111/acel.12841>



- Parenti, G., Medina, D. L., & Ballabio, A. (2021). The rapidly evolving view of lysosomal storage diseases. *EMBO molecular medicine*, 13(2), e12836. <https://doi.org/10.15252/emmm.202012836>
- Pierzynowska, K., Gaffke, L., Cyske, Z., Puchalski, M., Rintz, E., Bartkowski, M., Osiadły, M., Pierzynowski, M., Mantej, J., Piotrowska, E., & Węgrzyn, G. (2018). Autophagy stimulation as a promising approach in treatment of neurodegenerative diseases. *Metabolic Brain Disease*, 33(4), 989–1008. <https://doi.org/10.1007/s11011-018-0214-6>
- Ponpuak, M., Mandell, M. A., Kimura, T., Chauhan, S., Cleyrat, C., & Deretic, V. (2015). Secretory autophagy. *Current Opinion in Cell Biology*, 35(1), 106–116. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.04.016>
- Porter, K., Nallathambi, J., Lin, Y., & Liton, P. B. (2013). Lysosomal basification and decreased autophagic flux in oxidatively stressed trabecular meshwork cells: implications for glaucoma pathogenesis. *Autophagy*, 9(4), 581–594. <https://doi.org/10.4161/auto.23568>
- Rachmian, N., & Krizhanovsky, V. (2023). Senescent cells in the brain and where to find them. *The FEBS Journal*, 290(5), 1256–1266. <https://doi.org/10.1111/febs.16649>
- Reimer, R. J., Schneider, K., Leal-Ortiz, S., Montenegro-Venegas, C., Kim, S. A., Garner, L. C., Gundelfinger, E. D., Reimer, R. J., & Garner, C. C. (2017). Bassoon Controls Presynaptic Autophagy through Atg5. *Neuron*, 93(4), 897–913.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.01.026>
- Rubinsztein, D. C., Mariño, G., & Kroemer, G. (2011). Autophagy and aging. *Cell*, 146(5), 682–695. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.030>
- Sah, E., Krishnamurthy, S., Ahmidouch, M. Y., Gillispie, G. J., Milligan, C., & Orr, M. E. (2021). The Cellular Senescence Stress Response in Post-Mitotic Brain Cells: Cell Survival at the Expense of Tissue Degeneration. *Life*, 11(3), 229. <https://doi.org/10.3390/life11030229>
- Saha, B. K., Graham, M. Y., & Schlessinger, D. (1979). Acid ribonuclease from HeLa cell lysosomes. *Journal of Biological Chemistry*, 254(13), 5951–5957. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)50504-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)50504-4)
- Sapieha, P., & Mallette, F. A. (2018). Cellular Senescence in Postmitotic Cells: Beyond Growth Arrest. *Trends in Cell Biology*, 28(8), 595–607. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.03.003>
- Schütter, M., Giavalisco, P., Brodesser, S., & Graef, M. (2020). Local Fatty Acid Channeling into Phospholipid Synthesis Drives Phagophore Expansion during Autophagy. *Cell*, 180(1), 135–149.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.12.005>
- Settembre, C., Fraldi, A., Medina, D. L., & Ballabio, A. (2013). Signals from the lysosome: A control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(5), 283–296. <https://doi.org/10.1038/nrm3565>
- Settembre, C., Zoncu, R., Medina, D. L., Vetrini, F., Erdin, S. S., Erdin, S. S., Huynh, T., Ferron, M., Karsenty, G., Vellard, M. C., Facchinetti, V., Sabatini, D. M., & Ballabio, A. (2012). A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *EMBO Journal*, 31(5), 1095–1108. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.32>
- Shehata, M., Matsumura, H., Okubo-Suzuki, R., Ohkawa, N., & Inokuchi, K. (2012). Neuronal Stimulation Induces Autophagy in Hippocampal Neurons That Is Involved in AMPA Receptor Degradation after Chemical Long-Term Depression. *Journal of Neuroscience*, 32(30), 10413–10422. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4533-11.2012>

- Sikora, E., Bielak-Zmijewska, A., Dudkowska, M., Krzystyniak, A., Mosieniak, G., Wesierska, M., & Wlodarczyk, J. (2021). Cellular Senescence in Brain Aging. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 13(February), 1–23. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.646924>
- Sleigh, J. N., Rossor, A. M., Fellows, A. D., Tosolini, A. P., & Schiavo, G. (2019). Axonal transport and neurological disease. *Nature Reviews Neurology*, 15(12), 691–703. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0257-2>
- Sulzer, D., Mosharov, E., Talloczy, Z., Zucca, F. A., Simon, J. D., & Zecca, L. (2008). Neuronal pigmented autophagic vacuoles: lipofuscin, neuromelanin, and ceroid as macroautophagic responses during aging and disease. *Journal of Neurochemistry*, 106(1), 24–36. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05385.x>
- Tang, G., Gudsruk, K., Kuo, S. H., Cotrina, M. L., Rosoklija, G., Sosunov, A., Sonders, M. S., Kanter, E., Castagna, C., Yamamoto, A., Yue, Z., Arancio, O., Peterson, B. S., Champagne, F., Dwork, A. J., Goldman, J., & Sulzer, D. (2014). Loss of mTOR-Dependent Macroautophagy Causes Autistic-like Synaptic Pruning Deficits. *Neuron*, 83(5), 1131–1143. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.07.040>
- Thadathil, N., Nicklas, E. H., Mohammed, S., Lewis, T. L., Richardson, A., & Deepa, S. S. (2021). Necroptosis increases with age in the brain and contributes to age-related neuroinflammation. *GeroScience*, 43(5), 2345–2361. <https://doi.org/10.1007/s11357-021-00448-5>
- Tresse, E., Riera-Ponsati, L., Jaber, E., Sew, W. Q. G., Ruscher, K., & Issazadeh-Navikas, S. (2021). IFN- $\beta$  rescues neurodegeneration by regulating mitochondrial fission via STAT5, PGAM5, and Drp1. *The EMBO Journal*, 40(11), 1–20. <https://doi.org/10.15252/embj.2020106868>
- Trivedi, P. C., Bartlett, J. J., & Pulini, T. (2020). Lysosomal Biology and Function: Modern View of Cellular Debris Bin. In *Cells* (Vol. 9, Issue 5). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/cells9051131>
- Wang, Z., Jiang, H., Chen, S., Du, F., & Wang, X. (2012a). The mitochondrial phosphatase PGAM5 functions at the convergence point of multiple necrotic death pathways. *Cell*, 148(1–2), 228–243. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.030>
- Wang, Z., Jiang, H., Chen, S., Du, F., & Wang, X. (2012b). The mitochondrial phosphatase PGAM5 functions at the convergence point of multiple necrotic death pathways. *Cell*, 148(1–2), 228–243. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.030>
- Wilhelm, T., Byrne, J., Medina, R., Kolundžic, E., Geisinger, J., Hajduskova, M., Tursun, B., & Richly, H. (2017). Neuronal inhibition of the autophagy nucleation complex extends life span in post-reproductive *C. Elegans*. *Genes and Development*, 31(15), 1561–1572. <https://doi.org/10.1101/gad.301648.117>
- Yang, C., Tian, F., Hu, M., Kang, C., Ping, M., Liu, Y., Hu, M., Xu, H., Yu, Y., Gao, Z., & Li, P. (2023). Characterization of the role of TMEM175 in an *in vitro* lysosomal H<sup>+</sup> fluxes model. *The FEBS Journal*. <https://doi.org/10.1111/febs.16814>
- Yang, C., & Wang, X. (2021). Lysosome biogenesis: Regulation and functions. In *Journal of Cell Biology* (Vol. 220, Issue 6). Rockefeller University Press. <https://doi.org/10.1083/jcb.202102001>
- Yesylevskyy, S. O., Demchenko, A. P., Kraszewski, S., & Ramseyer, C. (2013). Cholesterol induces uneven curvature of asymmetric lipid bilayers. *TheScientificWorldJournal*, 2013, 965230. <https://doi.org/10.1155/2013/965230>

- Yoon, S., Bogdanov, K., Kovalenko, A., & Wallach, D. (2016). Necroptosis is preceded by nuclear translocation of the signaling proteins that induce it. *Cell Death and Differentiation*, 23(2), 253–260. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.92>
- Yoon, S., Kovalenko, A., Bogdanov, K., & Wallach, D. (2017). MLKL, the Protein that Mediates Necroptosis, Also Regulates Endosomal Trafficking and Extracellular Vesicle Generation. *Immunity*, 47(1), 51-65.e7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.001>
- Yuan, J., Amin, P., & Ofengeim, D. (2019). Necroptosis and RIPK1-mediated neuroinflammation in CNS diseases. *Nature Reviews Neuroscience*, 20(1), 19–33. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0093-1>
- Zhan, C., Huang, M., Yang, X., & Hou, J. (2021). MLKL: Functions beyond serving as the Executioner of Necroptosis. *Theranostics*, 11(10), 4759–4769. <https://doi.org/10.7150/thno.54072>
- Zhang, Y., Su, S. S., Zhao, S., Yang, Z., Zhong, C. Q., Chen, X., Cai, Q., Yang, Z. H., Huang, D., Wu, R., & Han, J. (2017). RIP1 autophosphorylation is promoted by mitochondrial ROS and is essential for RIP3 recruitment into necrosome. *Nature Communications*, 8(May 2016). <https://doi.org/10.1038/ncomms14329>
- Zhao, Y. G., Codogno, P., & Zhang, H. (2021). Machinery, regulation and pathophysiological implications of autophagosome maturation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00392-4>