



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Ciencias Químicas

Centro de Química-Instituto de Ciencias

Posgrado en Ciencias Químicas

“Estudio del rol de los agregados proteicos en el envejecimiento”

Tesis presentada para obtener el grado de Doctorado en Ciencias Químicas del área
de Bioquímica y Biología Molecular

Presenta: Luz Karina Cuanalo Contreras

Directora de tesis: Dra. Lourdes Millán Pérez-Peña

Codirector de tesis: Dr. Claudio Soto Jara

2016

PÁGINA LEGAL

El presente trabajo de tesis fue financiado a través de la beca para estudios de posgrado número 230292/ 353186 y la beca 2014 - mzo2015 movilidad en el extranjero del CONACyT, otorgada a Luz Karina Cuanalo Contreras, alumna del Posgrado en Ciencias Químicas, BUAP.

La fundación Lawrence Ellison otorgó una beca completa para la asistencia de Luz Karina Cuanalo Contreras al curso “*The Molecular Biology of Aging*” que se llevó a cabo en el *Marine Biological Laboratory*, Woods Hole, Massachusetts, 2013.

OFICIO DE APROBACIÓN DE LA COMISIÓN REVISORA



BUAP

A QUIEN CORRESPONDA:

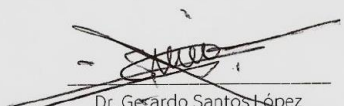
Por este conducto la Comisión Revisora formada por la Dra. Nora Hilda Rosas Murrieta, Dra. Patricia Aguilar Alonso, Dr. Gerardo Santos López, Dra. Verónica Vallejo Ruiz y Dra. Ana Paola Maycotte González, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada **“Estudio del rol de los agregados proteicos en el envejecimiento”**, que presenta la alumna **Luz Karina Cuanalo Contreras** para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas.

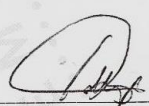
Se extiende la presente a los veintidós días del mes de noviembre del año dos mil dieciséis.

ATENTAMENTE


Dra. Nora Hilda Rosas Murrieta


Dra. Patricia Aguilar Alonso


Dr. Gerardo Santos López


Dra. Verónica Vallejo Ruiz


Dra. Ana Paola Maycotte González



Posgrado en Ciencias Químicas
Facultad de Ciencias Químicas
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio FCQ 10,
Ciudad Universitaria
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00 Ext. 7397
posgrado.quimica@correo.buap.mx



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

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

Delaying aging in *Caenorhabditis elegans* with protein aggregation inhibitors

Karina Cuanalo-Contreras^{a, b}, Kyung-Won Park^a, Abhisek Mukherjee^a,
 Lourdes Millán-Pérez Peña^b, Claudio Soto^{a, *}

^a Mitchell Center for Alzheimer's Disease and Related Brain Disorders, Department of Neurology, University of Texas Houston Medical School, 6431 Fannin St, Houston, TX 77030, USA

^b Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, Centro de Química, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Pue, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 October 2016

Accepted 29 October 2016

Available online xxx

Keywords:

Aging
 Protein misfolding
C. elegans
 Aggregation inhibitors
 Lifespan

ABSTRACT

Recent evidence suggests that during aging there is widespread accumulation of aggregated insoluble proteins, even in the absence of pathological conditions. Pharmacological manipulation of protein aggregation might be helpful to unveil the involvement of protein aggregates during aging, as well as to develop novel strategies to delay aging. Here we investigated the effect of known protein aggregation inhibitors on the lifespan and health-span of *Caenorhabditis elegans*. For this purpose, we selected various structurally diverse anti-aggregation compounds and screened them in liquid and solid medium for their ability to alter the rate of aging *in vivo*. Our results show that treatment of *C. elegans* with diverse aggregation inhibitors significantly increases the animal lifespan and health-span. These findings indicate that protein misfolding and aggregation may play an important role in cellular dysfunction during aging, opening a novel approach to increase longevity and enhance the quality of life during aging.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Aging can be defined as a progressive loss of function that increases vulnerability to environmental factors and augments the risk of disease and death. It is crucial to better understand the mechanisms implicated in cellular dysfunction during aging because the elderly population is substantially growing. By 2050, the population over 65 years old is expected to reach more than 83 million in the United States and is estimated to be 2.5 times more than the population of ages 0 to 4 worldwide [1]. As people age, there is an elevated risk of developing certain pathological conditions that impact the quality of life, which is accompanied by increased medical care expenses. Several mechanisms have been proposed to be responsible for aging, including accumulation of damaged proteins, telomere-shortening, oxidative damage, somatic mutations, mitochondrial damage and epigenetic changes [2–8]. The age-related accumulation of altered proteins is of particular interest because of the well-established contribution of

specific protein aggregates in age-related protein misfolding disorders, such as Parkinson's disease and Alzheimer's disease [9,10]. Protein aggregation during the aging process remains largely uncharacterized, despite evidence suggesting an inverse correlation with longevity. Multiple *in vivo* models, such as *Caenorhabditis elegans* and *Saccharomyces cerevisiae*, exhibit an age-dependent and widespread accumulation of different insoluble proteins [11–13]. Indeed, a previous study in the worm showed that more than 400 different proteins consistently become insoluble during aging [11]. Moreover, various studies have shown that lifespan and healthspan can be increased by reducing protein aggregates via modulation of protein clearance pathways (i.e. autophagy, proteasome) [14–21]. Furthermore, the recent quest for small compounds to enhance longevity revealed several molecules with a dual effect that increases lifespan and reduces protein aggregation [22–24], including established amyloid binding compounds [22,25]. Collectively this data emphasizes the potential for targeting protein aggregation for the purpose of extending longevity and improving the health of our aged population.

Various aggregation inhibitors have been reported for amyloid-beta, tau, α -synuclein and the prion protein [26–32]. In the present study, a group of known and structurally diverse protein

* Corresponding author.

E-mail address: Claudio.Soto@uth.tmc.edu (C. Soto).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.143>

0006-291X/© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

RESUMEN

El envejecimiento se define como la pérdida progresiva de la función que incrementa la vulnerabilidad a los factores ambientales, enfermedades que conducen a la muerte. La evidencia reciente sugiere que existe una acumulación de distintas proteínas insolubles durante el envejecimiento, incluso en ausencia de condiciones patológicas. La hipótesis de este trabajo consiste en que durante el envejecimiento existe una acumulación progresiva de agregados proteicos de tipo amiloide y estos juegan un rol en el proceso de envejecimiento. Para explorar lo anterior, se utilizó una batería de técnicas dirigidas a la caracterización de la agregación proteica durante el envejecimiento en distintos modelos. Los resultados indican que existe un incremento progresivo en la cantidad de proteínas insolubles, que presentan resistencia a la digestión y reactividad a anticuerpos conformacionales anti-amiloide y a la tioflavina T, lo cual sugiere que existe acumulación de agregados amiloides durante la vida. Para elucidar si la agregación proteica juega un rol en el envejecimiento, se manipuló *in vivo* dicho proceso utilizando inhibidores de la agregación, el tratamiento incrementó de manera significativa la vida y salud en *C. elegans*. En este trabajo se propone un modelo en el cual, durante el envejecimiento, distintas proteínas sufren plegamientos anómalos de tipo amiloides, lo que pudiera interferir con las funciones normales de la célula y ocasionar el fenotipo observado en el envejecimiento. En conjunto, la evidencia presentada sugiere que la acumulación de agregados amiloides es una característica conservada en el envejecimiento y que la prevención o remoción de los mismos pudiera ser una herramienta terapéutica para extender los años de vida activa y la salud.

ABSTRACT

Aging is defined as a progressive loss of function that increases the vulnerability to environmental factors, disease and death. Recent evidence suggests that there is accumulation of many different insoluble proteins during aging, even in the absence of pathological conditions. We hypothesize that those proteins associate in amyloid aggregates and may play a role in the aging process, rather than being just a consequence of it. Using a battery of different techniques, we performed a characterization of the protein aggregation during aging in different models. We found a progressive increase in the amount of insoluble proteins that exhibit resistance to digestion, reactivity to amyloid conformational antibodies and thioflavin T, suggesting that there is accumulation of amyloid aggregates during lifespan. To elucidate if protein aggregation plays a role in aging, we manipulated the aggregation process *in vivo* using inhibitors of aggregation and found that the treatment significantly extended lifespan and healthspan in *C. elegans*. We proposed a model where, during aging, several proteins may suffer misfolding and accumulate in the form of amyloids, which could interfere with normal cellular function and cause the phenotype observed during aging. Taken together, the presented evidence suggests that the accumulation of amyloid aggregates is a conserved feature of aging and that the prevention or removal of such aggregates could be an interesting anti-aging therapeutical approach that will be helpful to extend the years of active and healthy life.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, al Posgrado en Ciencias Químicas, al área de Bioquímica y Biología Molecular y a la Universidad de Texas en Houston, por el apoyo brindado para la realización de esta tesis de doctorado.

Así mismo, expreso un especial agradecimiento para mis directores de tesis Dra. Lourdes Millán y Dr. Claudio Soto, por su profesionalismo, guía, paciencia y compromiso con este trabajo de investigación, así como por su interés en mi desarrollo personal y profesional.

Agradezco a los miembros de mi Comisión Revisora y Jurado de Tesis, Dra. Nora Hilda Rosas Murrieta, Dr. Gerardo Santos López, Dra. Patricia Aguilar Alonso, Dra. Verónica Vallejo Ruiz y Dra. Paola Maycotte González, por su tiempo, consejos y observaciones, ya que fueron indispensables durante el proceso de diseño y realización de experimentos, así como en la escritura, presentación y discusión de resultados. Quisiera agradecer también al Dr. Abhisek Mukherjee y al Dr. Kyong Park por su apoyo académico y guía científica.

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mi familia, en especial a mi madre María de la Luz Contreras Palacios por su apoyo incondicional y a Gaël Sgarbi por ser la luz que ilumina mis días.

ÍNDICE

PÁGINA LEGAL	1
OFICIO DE APROBACIÓN DE LA COMISIÓN REVISORA	2
PUBLICACIÓN DERIVADA DE LA TESIS	3
RESUMEN	4
ABSTRACT.....	5
AGRADECIMIENTOS	6
DEDICATORIA	7
ÍNDICE	8
LISTA DE ABREVIATURAS	11
LISTA DE FIGURAS.....	13
LISTA DE TABLAS	16
CAPÍTULO I	17
I.1 ANTECEDENTES	17
I.1.1 Teorías del envejecimiento	18
I.1.1.1 Teoría del estrés oxidativo.....	18
I.1.1.2 Teoría metabólica	19
I.1.1.3 Teoría del daño al DNA.....	19
I.1.1.4 Teoría epigenética.....	19
I.1.1.5 Teoría del acortamiento de los telómeros.....	20
I.1.2 Plegamiento anómalo de proteínas y envejecimiento.....	20
I.1.3 Plegamiento proteico anormal y formación de agregados de proteínas	22
I.1.4 Compuestos inhibidores de la agregación proteica.....	24
I.1.5 Proteostasis	25
I.1.5.1 Autofagia	26
I.1.5.2 Sistema de degradación ubiquitina-proteasoma (UPS)	28
I.1.5.2.1 Estructura	29
I.1.5.2.2 Actividad proteolítica.....	30
I.1.5.2.3 Apertura	31
I.1.5.2.4 Proteasoma y envejecimiento	31
I.1.5.2.5 Proteasoma arqueano	32
I.1.6 Modelos experimentales para el estudio del envejecimiento.....	33
I.1.6.1 <i>Caenorhabditis elegans</i>	34

I.1.6.2	Fibroblastos embrionicos murinos.....	34
I.1.6.3	<i>Mus musculus</i>	35
I.2	JUSTIFICACIÓN	37
I.3	HIPÓTESIS.....	37
I.4	OBJETIVOS	37
I.4.1	Objetivo general.....	37
I.4.2	Objetivos específicos	38
CAPÍTULO II.	Parte experimental	39
II.1	Caracterización de los agregados proteicos generados durante el envejecimiento en los modelos <i>Caenorhabditis elegans</i> , FEMs y <i>Mus musculus</i>	39
II.1.1	Grupos experimentales.....	39
II.1.1.1	Cultivo y colección de <i>Caenorhabditis elegans</i>	39
II.1.1.2	Cultivo y colección de FEMs	40
II.1.1.3	<i>Mus musculus</i>	41
II.1.2	Preparación de homogeneizados totales	41
II.1.2.1	<i>Caenorhabditis elegans</i>	41
II.1.2.2	FEMs	42
II.1.2.3	<i>Mus musculus</i>	42
II.1.3	Caracterización de la senescencia en FEMs	43
II.1.3.1	Poblaciones duplicadas (PD)	43
II.1.3.2	Tinción de faloidina.....	43
II.1.3.3	Ensayo de incorporación de 5-bromodeoxiuridina (BrdU)	43
II.1.4	Extracción y cuantificación de proteínas insolubles.....	44
II.1.5	Ensayo de tioflavina T	45
II.1.6	Ensayo de resistencia a la digestión proteica.....	46
II.1.7	Técnicas inmunoquímicas.....	46
II.1.7.1	<i>Caenorhabditis elegans</i>	46
II.1.7.2	FEMs	47
II.1.7.3	Dot blots	48
II.2	Inhibición farmacológica de la agregación proteica como estrategia para retrasar el envejecimiento en <i>Caenorhabditis elegans</i>	48
II.2.1	Cultivo y mantenimiento de <i>Caenorhabditis elegans</i>	49
II.2.2	Evaluación de compuestos inhibidores de la agregación en medio líquido.....	50
II.2.3	Evaluación de la longevidad y estado de salud en medio sólido	51
II.2.4	Análisis estadístico.....	52

II.3 Manipulación de la proteostasis en <i>Caenorhabditis elegans</i> como estrategia para alterar el envejecimiento	53
II.3.1 Clonación y transformación	54
II.3.2 Microinyección	56
II.3.3 Integración	56
II.3.4 Medición de niveles de expresión y actividad proteasomal.....	57
CAPÍTULO III: Resultados	59
III.1 Caracterización de los agregados proteicos generados durante el envejecimiento en <i>Caenorhabditis elegans</i> , FEMs y <i>Mus musculus</i>	59
III.1.1 Caracterización de la senescencia en el modelo de FEMs.....	59
III.1.2 Insolubilidad proteica.....	61
III.1.3 Ensayo de tioflavina T	64
III.1.4 Resistencia a la digestión proteica	69
III.1.5 Inmunoquímica con anticuerpos conformacionales.....	72
III.2 Inhibición farmacológica de la agregación proteica como estrategia para retrasar el envejecimiento en <i>Caenorhabditis elegans</i>	77
III.2.1 Identificación de compuestos inhibidores de la agregación que prolongan la sobrevivencia media en <i>Caenorhabditis elegans</i>	77
III.2.2 Estudio de la longevidad en medio sólido	79
III.2.3 Estudio del envejecimiento biológico en medio sólido	81
III.3 Manipulación de la proteostasis en <i>Caenorhabditis elegans</i> como estrategia para alterar el envejecimiento	84
III.3.1 Generación de los plásmidos	84
III.3.2 Microinyección e integración	88
III.3.3 Medición de los niveles de expresión y de actividad proteasomal	90
CAPÍTULO IV: Discusión y conclusiones.....	93
IV.1 Perspectivas	105
BIBLIOGRAFÍA	107
Apéndice I. Preparación de soluciones	117
Apéndice II. “Delaying aging in <i>Caenorhabditis elegans</i> with protein aggregation inhibitor ...	122

LISTA DE ABREVIATURAS

ANSA, ácido 8-Anilino-1-naftalenesulfónico

BrdU, 5-bromodeoxiuridina

C. elegans, *Caenorhabditis elegans*

CT, choque térmico

DIV, días *in vitro*

DMSO, dimetilsulfóxido

DMF, dimetilformamida

DNA, ácido desoxirribonucleico

DTT, ditioneitol

E. coli, *Escherichia coli*

FEMs, fibroblastos embrionicos murinos

FOXO, factor de transcripción *forkhead box*

FRET, transferencia resonante de energía en fluorescencia

FUdR, fluorodeoxiuridina

HT, homogeneizado total

IGF-1, factor de crecimiento insulínico tipo I

NGM, medio de crecimiento de nemátodos

NM, nemátodos microinyectados

PCR, reacción en cadena de la polimerasa

PBS, solución salina amortiguada de fosfatos

PD, poblaciones duplicadas

PK, proteinasa K

PMSF, fluoruro de fenilmetilsulfonilo

RNA, ácido ribonucleico

SASP, fenotipo secretorio asociado a la senescencia

SOD1, superóxido dismutasa 1

TCT, Tris-Carragenina-Tritón

UF, unidades de fluorescencia

UPS, sistema de degradación ubiquitina-proteasoma

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de nucleación-polimerización en el proceso de formación de agregados amiloides.

Figura 2. Estructura del proteasoma eucariota.

Figura 3. Esquema metodológico utilizado para la caracterización de los agregados proteicos durante el envejecimiento en los modelos seleccionados.

Figura 4. Esquema metodológico utilizado para el estudio de la inhibición farmacológica de la agregación proteica en *Caenorhabditis elegans*.

Figura 5. Esquema metodológico utilizado para la manipulación de la proteostasis en *Caenorhabditis elegans*.

Figura 6. Caracterización de la senescencia en los grupos de FEMs usados en este estudio.

Figura 7. Porcentaje de proteína insoluble en muestras de *Caenorhabditis elegans*, FEMs y ratón.

Figura 8. Electroforesis SDS-PAGE y tinción de Coomassie de los homogeneizados totales y fracciones insolubles de muestras de ratón.

Figura 9. Señal de tioflavina T expresada en unidades de fluorescencia (UF) en la fracción insoluble.

Figura 10. Señal de tioflavina T expresada en unidades de fluorescencia (UF) en la fracción insoluble pre-tratada con PK.

Figura 11. Espectro de emisión de fluorescencia de las fracciones insolubles de muestras de ratón en presencia de tioflavina T.

Figura 12. Proteína no digerida en muestras de homogeneizados totales de *Caenorhabditis elegans*, FEMs, y fracciones insolubles de ratón.

Figura 13. *Caenorhabditis elegans* a los días 1, 5 y 10, teñidos con los anticuerpos A11, OC y señal de autofluorescencia en el canal rojo.

Figura 14. FEMs a los PD 3 y PD 8 teñidos con los anticuerpos A11, OC y anticuerpo secundario Alexa Fluor 594.

Figura 15. *Dot blot* con los anticuerpos conformacionales A11 y OC en muestras de distintas edades de *Caenorhabditis elegans*, FEMs y fracciones insolubles de ratón.

Figura 16. Estructura de los inhibidores de la agregación utilizados en este estudio A) Miricetina, B) Quinacrina, C) Lacmoide, D) Rodanina, E) Negro clorazol, F) ANSA y G) Curcumina.

Figura 17. Curvas de sobrevivencia de los nemátodos tratados en medio sólido.

Figura 18. Tasa de bombeo faríngeo de los nemátodos.

Figura 19. Clonación de las subunidades α y β del proteasoma de *Thermoplasma acidophilum* en el plásmido pCM1.57.

Figura 20. Alineamiento de la secuencia clonada de la subunidad α del proteasoma arqueano con la secuencia reportada.

Figura 21. Alineamiento de la secuencia clonada de la subunidad β del proteasoma arqueano con la secuencia reportada.

Figura 22. Análisis de los productos de la PCR y Western blot de las subunidades α y β .

Figura 23. Representación esquemática del proceso de apareamiento entre las líneas integradas generadas ($\alpha\beta$) y nemátodos N2 cepa salvaje.

Figura 24. Confirmación de la presencia de la información genética y de la expresión de las subunidades α y β beta del proteasoma arqueano en las líneas transgénicas integradas generadas.

Figura 25. RT-PCR de las subunidades α y β del proteasoma arqueano en muestras de *Caenorhabditis elegans* cepa 55 expuestas a distintas temperaturas y tiempos de inducción.

Figura 26. Ensayo de actividad proteasomal en muestras de *C. elegans* cepa N2 y 55, sometidas a un choque térmico de 33 °C por 1 hora en el día 1 de vida adulta.

Figura 27. Modelo propuesto del rol de los agregados proteicos durante el envejecimiento.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Compuestos y controles utilizados para la evaluación de inhibidores de la agregación en medio líquido.

Tabla 2. Códigos de acceso en la base de datos de nucleótidos del NCBI para las subunidades α y β del proteasoma de *Thermoplasma acidophilum*. Se incluyen además las secuencias de los oligos diseñados y los ciclos seleccionados para la PCR.

Tabla 3. Resultados del estudio en medio líquido.

Tabla 4. Evidencia de la acumulación de agregados amiloides durante el envejecimiento en distintos modelos.

CAPÍTULO I

I.1 ANTECEDENTES

El estudio de las causas del envejecimiento es uno de los problemas más desafiantes y aún no resueltos en la biología. El interés público y científico en este campo se ha incrementado considerablemente, no sólo porque la mayoría de las personas esperan vivir hasta una edad avanzada, sino porque desean evitar los cambios relacionados con la edad que finalmente desembocan en incapacidad física y enfermedades.

Para el año 2050, la población mundial mayor de 60 años se triplicará y pasará de 600 millones a 2000 millones. La mayor parte de ese aumento se producirá en los países menos desarrollados [1].

En lo que respecta a México, las transiciones demográficas y epidemiológicas provocan que nuestro país experimente un proceso de envejecimiento demográfico que incrementa los números absolutos y porcentuales de la población en edad avanzada. Se proyecta que para el 2030 en México habrá 15.2 millones de personas con más de 65 años, lo que corresponde al 11.7% de la población [2].

Este cambio demográfico tiene varias consecuencias para la salud pública, ya que a pesar de que la expectativa de vida ha aumentado, el estado de salud no se ha mejorado proporcionalmente y parece que el envejecimiento es el mayor factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades crónicas, lo cual implica un aumento en los costos derivados del tratamiento de dichas enfermedades. Gozar de buena salud es fundamental para que las personas mayores mantengan su independencia y puedan tener un lugar tanto en la vida familiar como en su comunidad [1].

El envejecimiento es un proceso conservado evolutivamente que se caracteriza por la acumulación progresiva y generalizada de cambios con respecto al tiempo, específicamente relacionados con la

alteración bioquímica en la composición tisular y la pérdida de función, que resultan en un incremento de la susceptibilidad a padecer enfermedades, menor capacidad adaptativa, vulnerabilidad a factores ambientales y un mayor riesgo de muerte [3,4]. Entre dichos cambios, se encuentran la pérdida de masa muscular y ósea, alteraciones metabólicas, disminución en la función cognitiva, renal, pulmonar, endocrina e inmune [5]. Se ha propuesto que el envejecimiento es regulado a través de una interacción estrecha entre el genoma y el ambiente [3]. La naturaleza del proceso de envejecimiento ha sido sujeto de una gran especulación. Se han postulado más de 300 teorías [6] muchas de las cuales son contradictorias entre sí. Actualmente no existe una teoría universal que explique dicho proceso.

I.1.1 Teorías del envejecimiento

Las teorías del envejecimiento pueden dividirse en dos grandes ramas, teorías del error y teorías de la programación. Las teorías del error sustentan que el envejecimiento es producto de la acumulación gradual de daño molecular (DNA, lípidos, proteínas). Mientras que las teorías de la programación argumentan que los organismos están programados para envejecer y vivir por un periodo de tiempo genéticamente determinado [3,6–8]. A continuación, se presenta un breve resumen de las teorías del envejecimiento con mayor aceptación en la actualidad.

I.1.1.1 Teoría del estrés oxidativo

El envejecimiento es producto de la acumulación progresiva e irreversible de daño molecular causado por radicales libres, la mayoría de ellos generados durante el metabolismo oxidativo de la mitocondria. En una célula joven existe un balance adecuado entre el daño oxidativo y los mecanismos antioxidantes de defensa exógenos (ej. Vitamina C, E) y endógenos (enzimas antioxidantes), mientras que una célula envejecida ha perdido en gran medida esa capacidad. Las

células postmitóticas envejecen más rápidamente pues acumulan daño oxidativo a lo largo del tiempo y sufren más cambios relacionados con la edad (disfunción de los organelos, senescencia y muerte) [3,6–8].

I.1.1.2 Teoría metabólica

La tasa metabólica (consumo energético) de una especie determina su expectativa de vida. En esta ruta está involucrada la desregulación de la función del IGF-1 (factor de crecimiento insulínico tipo I) que a su vez regula la actividad de los factores de transcripción FOXO que inducen la expresión de enzimas de defensa antioxidante y de resistencia al estrés térmico. Los modelos con mutaciones funcionales en esta ruta, exhiben un incremento en la longevidad [3,6–8].

I.1.1.3 Teoría del daño al DNA

El daño al DNA se incrementa durante el envejecimiento pues es acumulativo, extensivo y no puede ser reparado. Durante el envejecimiento la capacidad de los sistemas de reparación de DNA disminuye. Entre los sistemas que más se ven afectados se encuentran el supresor de tumores p53, que está implicado en el mantenimiento de la estabilidad genómica y tiene un rol en la respuesta al daño del DNA celular y la helicasa WRN, que es una exonucleasa que posee una función en la replicación del DNA y mantenimiento de los telómeros [3,6–8].

I.1.1.4 Teoría epigenética

Durante el envejecimiento existen cambios en los patrones epigenéticos que contribuyen a un desequilibrio en la función celular y consecuentemente a la aparición de enfermedades relacionadas con el envejecimiento [9]. La metilación de las regiones CpG disminuye con el envejecimiento debido a una declinación progresiva de la actividad de las DNA metiltransferasas. Otras enzimas que pierden su actividad durante el proceso de envejecimiento son las sirtuinas

(*silent information regulators*), que son una familia de histonas desacetilasas clase III dependientes de NAD⁺ que se activan como respuesta al estrés con el objetivo de proteger y estabilizar el genoma, por lo tanto la reparación del DNA disminuye [8–10].

I.1.1.5 Teoría del acortamiento de los telómeros

Sostiene que el acortamiento progresivo de los telómeros (TTAGGG) es la causa del envejecimiento, al provocar senescencia en la célula y limitar el número de divisiones de la misma, lo que resulta en la detención del ciclo celular una vez que estos llegan a una longitud límite (límite de Hayflick). Los telómeros disminuyen la inestabilidad genómica pues la secuencia telomérica GGG es un sitio de daño oxidativo frecuente que provee protección contra el daño a otros sitios del DNA. La telomerasa es la enzima que mantiene la longitud de los telómeros al añadir secuencias teloméricas repetidas. Durante el envejecimiento la actividad de esta enzima disminuye [11].

I.1.2 Plegamiento anómalo de proteínas y envejecimiento

Las proteínas son macromoléculas clave que llevan a cabo diversas funciones en los organismos vivos, incluyendo la replicación del material genético, mantenimiento de la estructura celular, catabolizan reacciones metabólicas, participan en la señalización y adhesión celular, respuesta inmune, transporte de moléculas etc. La vida depende de la función apropiada de miles de proteínas, la cual a su vez depende de la adquisición de un plegamiento correcto biológicamente funcional.

Las proteínas se encuentran en continuo riesgo de sufrir daños, plegamiento anormal, agregación y como resultado originan toxicidad y enfermedad. Actualmente hay al menos 30 enfermedades humanas reportadas que están asociadas al plegamiento anormal de proteínas, donde al menos una

proteína en particular sufre un plegamiento anómalo y se acumula en una estructura fibrilar bien organizada, conocida como amiloide [12,13]. La lista incluye varias enfermedades neurodegenerativas como enfermedad de Alzheimer, Parkinson, Huntington, así como desórdenes sistémicos entre los cuales se encuentran la diabetes tipo II y amiloidosis secundaria [14]. El campo de la agregación proteica se ha ampliado desde 1998, cuando se demostró que dos proteínas (no relacionadas con ninguna amiloidosis) poseían la capacidad para formar agregados *in vitro* [15,16]. Se ha sugerido que bajo condiciones propicias para la desestabilización estructural (pH ácido, temperatura elevada, ausencia de ligandos o concentraciones moderadas de sales), se desestabilizan las interacciones terciarias (puentes de hidrógeno principalmente) y se favorecen los contactos secundarios. De tal manera, que la proteína se pliega formando una estructura globular en la que las interacciones secundarias se mantienen pero los residuos hidrofóbicos, ocultos normalmente, se exponen al solvente. La estabilidad fisicoquímica se reduce y permite que los monómeros parcialmente desplegados se organicen en oligómeros que eventualmente podrían convertirse en fibras maduras [16,17].

Un factor de riesgo para el desarrollo de la mayoría de desórdenes del plegamiento anormal de proteínas, en particular enfermedades neurodegenerativas, es el envejecimiento [18]. Lo anterior indica que las células y tejidos envejecidos son más susceptibles a la formación y acumulación de agregados proteicos relacionados con procesos patológicos. Recientemente se ha reportado que la acumulación de cientos de proteínas insolubles, pudiera ser un proceso que ocurre normalmente durante el envejecimiento, con una coincidencia substancial entre las proteínas insolubles reportadas en distintas especies [19–22]. Sin embargo, hasta el momento no se cuenta con una caracterización de los agregados generados durante dicho proceso y se desconoce el rol de los mismos en la disminución progresiva de la función celular y tisular. Diversos estudios indican que

existe un nivel elevado de hidrofobicidad proteica en cerebros de ratas envejecidas [23]. Adicionalmente, un estudio en *Drosophila* reportó la acumulación de agregados proteicos insolubles en detergente en distintos tejidos durante el envejecimiento [24]. En el caso de *Caenorhabditis elegans*, se ha identificado el proteoma insoluble durante el envejecimiento, por medio de la extracción de proteínas y posterior identificación usando espectroscopía de masas. El análisis computacional de estas proteínas indicó que tienen una alta propensión para formar láminas β y los análisis *in vivo* han demostrado que algunas de esas proteínas tienden a acumularse y formar estructuras similares a agregados [19]. La observación de que la longevidad en *C. elegans* se incrementa al realizar un silenciamiento selectivo de las proteínas insolubles y susceptibles a la agregación, es un indicativo de que la acumulación de proteínas insolubles no es una simple consecuencia durante el envejecimiento [19]. Otra evidencia que apunta hacia la misma dirección, es el hecho de que al administrar compuestos que se unen a amiloides fue posible incrementar la longevidad en el nemátodo, apoyando la importancia del rol de los agregados proteicos en el envejecimiento [25]. Un efecto similar fue observado a través de la estimulación específica de las rutas celulares involucradas en la remoción de los agregados proteicos en *C. elegans*, *Drosophila melanogaster* y *Mus musculus* [26–29].

I.1.3 Plegamiento proteico anormal y formación de agregados de proteínas

El plegamiento normal de una proteína depende de la secuencia de aminoácidos de la misma y de la maquinaria de plegamiento celular. Sin embargo, bajo ciertas circunstancias como estrés o mutaciones, suceden procesos anormales de plegamiento que finalmente desembocan en la agregación proteica y pueden resultar en la pérdida de la función de la proteína o en la generación de estructuras tóxicas para la célula. Los eventos de plegamiento anómalo se han relacionado con algunas patologías [14,30–33].

La agregación proteica parece ser una propiedad general de las cadenas polipeptídicas, relacionada con el esqueleto peptídico e independiente de la secuencia aminoacídica. A pesar de las diferencias estructurales y químicas de las proteínas que forman agregados amiloides, éstos poseen características estructurales y bioquímicas similares. Los depósitos de proteínas alteradas conformacionalmente se organizan en estructuras oligoméricas insolubles. Tienen un plegamiento que favorece la agregación en estructuras de hoja β -plegada, lo que les confiere resistencia a la proteólisis y depuración celular. Adicionalmente, tienen la característica de unirse al colorante tioflavina, lo que se ha explotado para su detección y cuantificación. Se ha sugerido que la tioflavina se une a la superficie de las hojas β -plegada a lo largo de los canales formados en la arquitectura de los agregados amiloides [30].

Los procesos de agregación proteica se caracterizan por ser lentos y organizados. Uno de los modelos más aceptados para la formación de estructuras amiloidogénicas es el modelo de nucleación-polimerización, que consiste en una cinética particular que se encuentra definida por dos fases (**Figura 1**). La primera es conocida como fase de retardo, en la que suceden los primeros eventos de formación de núcleos de polimerización. La segunda fase o fase exponencial, consiste en un reclutamiento de nuevas unidades a los agregados previamente formados, resultando en una gran carga de estructuras amiloides. Presuntamente, estos agregados están relacionados con la disfunción y muerte celular. Se cree que la proteína involucrada, al adquirir una nueva conformación, pierde su función original produciendo alteraciones en procesos esenciales para el desarrollo y sobrevivencia celular. También es posible que la nueva conformación adquirida por la proteína tenga efectos tóxicos para la célula debido a la acumulación del conformero mal plegado [30].

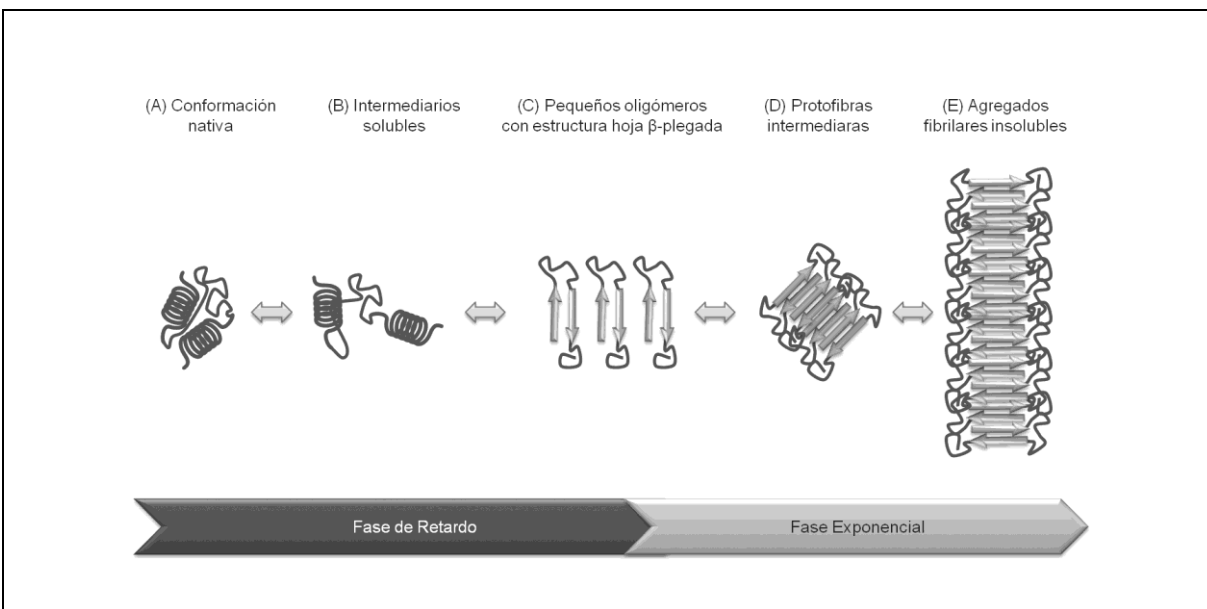


Figura 1. Modelo de nucleación-polimerización en el proceso de formación de agregados amiloides [30].

I.1.4 Compuestos inhibidores de la agregación proteica

Existen compuestos que tienen la capacidad de inhibir la agregación *in vitro* de proteínas asociadas con enfermedades, tales como la proteína β-amiloide, tau, α-sinucleína y la forma patológica de la proteína priónica.

El mecanismo preciso de acción de estos compuestos se encuentra todavía en debate, sin embargo, ensayos libres de células y estudios de dinámica molecular sugieren que reconocen directamente las conformaciones asociadas a agregados proteicos [34–39]. Dicha característica los hace particularmente interesantes para estudiar sus efectos *in vivo*, donde se ha reportado que varias proteínas forman agregados. La miricetina, quinacrina, curcumina y lacmoide son inhibidores de la agregación de la proteína β-amiloide y de tau [38–43]. Adicionalmente, la disrupción de los agregados de α-sinucleína y tau puede lograrse con el negro de clorazol y la rodanina, respectivamente [35,40,44]. La quinacrina posee las actividades mencionadas anteriormente y

además inhibe la fibrilación de la proteína priónica [45]. A pesar de que no hay estudios que demuestren que el ANSA actúa como inhibidor de la agregación proteica, se ha reportado que tiene la capacidad de unirse a las regiones hidrofóbicas de especies oligoméricas prefibrilares de la proteína β -amiloide [46] y se usa como una sonda fluorescente para identificar cambios conformacionales de proteínas [47].

I.1.5 Proteostasis

Los mecanismos de síntesis, plegamiento y degradación de proteínas son conocidos en conjunto como homeostasis de proteínas o proteostasis [48,49]. La red de proteostasis controla la concentración, localización subcelular, plegamiento a través de chaperonas y enzimas, la degradación proteica mediada por el proteasoma, lisosoma y autofagia, entre otras. La degradación de proteínas dañadas o alteradas es un evento esencial para preservar la función celular. Los defectos en la proteostasis comúnmente conducen a un plegamiento aberrante, agregación y acumulación de proteínas. El balance entre la síntesis y degradación proteica (recambio proteico) es cuidadosamente mantenido en las células jóvenes, sin embargo con el paso del tiempo la acumulación de proteínas alteradas excede la capacidad de dicha maquinaria, lo que ocasiona que durante el envejecimiento se acumulen proteínas dañadas [19–21] con la consecuente pérdida de función celular típica del envejecimiento, produciendo daño celular y disfunción tisular.

Enfatizando el rol de los agregados proteicos en el envejecimiento, se ha reportado que la estimulación de las rutas celulares involucradas en la degradación de agregados proteicos usando métodos tanto genéticos como ambientales, ha logrado incrementar el tiempo de vida en diversos organismos modelo [26–29].

En la célula eucariota existen dos mecanismos para la degradación de las proteínas dañadas, la autofagia y el sistema de degradación ubiquitina proteasoma [50].

I.1.5.1 Autofagia

La autofagia es un proceso catabólico que consiste en la degradación de componentes celulares dentro del lisosoma. Normalmente se activa durante condiciones de estrés, como un mecanismo de protección para asegurar la sobrevivencia y la homeostasis celular. A pesar de que se considera como un proceso adaptativo, algunos estudios sugieren que un nivel basal de autofagia se encuentra siempre activo [51]. Existen tres tipos de autofagia, dependiendo de los mecanismos utilizados para la captura y degradación de sustratos: autofagia mediada por chaperonas, microautofagia y macroautofagia. En la autofagia mediada por chaperonas, las proteínas que contienen el péptido KFERQ son reconocidas por la proteína de choque térmico Hsp70 y transportadas al lisosoma para su hidrólisis. La microautofagia es un proceso en el cual algunas porciones del citosol son englobadas en lisosomas, sin la intervención de chaperonas. La macroautofagia involucra el secuestro de organelos dañados o de agregados proteicos grandes en vesículas de carga conocidas como autofagosomas, que transportan sus contenidos al lisosoma para su degradación [52].

La autofagia juega un rol en los desórdenes del plegamiento de proteínas, así como en el envejecimiento. Se ha descrito la acumulación de vacuolas autofágicas en distintos procesos neurodegenerativos, y se sabe que algunas proteínas con tendencia a la agregación y relacionadas con distintas enfermedades, tales como la enfermedad de Alzheimer (tau), Parkinson (α -sinucleína) y Huntington (huntingtina), son sustratos de la autofagia [53–55]. Adicionalmente, se ha reportado que la elevación de los niveles de autofagia reduce la acumulación de agregados de huntingtina, así como su toxicidad en modelos celulares, de *Drosophila* y de ratón [56–59]. Así mismo, la inhibición de la autofagia exagera la agregación proteica y toxicidad en estos modelos. En un modelo de ratón de la enfermedad de Alzheimer, la delección de la proteína beclina 1 (que

participa en la regulación de la autofagia) causó una reducción de la autofagia, lo cual incrementó la neurodegeneración relacionada con la enfermedad, incluyendo la deposición extra e intracelular de la proteína β -amiloide. Al realizar la recuperación parcial de la autofagia a través de la expresión de beclina 1, fue posible reducir la patología. De manera similar, al estimular farmacológicamente la autofagia, se observó un incremento en la remoción de agregados de la proteína β -amiloide en un modelo de ratón de Alzheimer [60,61]. La reducción específica de la autofagia en el sistema nervioso central a través de una deficiencia condicional de *atg7* (gen blanco de la autofagia 7), resultó en la pérdida de neuronas piramidales en el hipocampo, corteza y células de Purkinje en el cerebelo [62]. Un resultado similar se obtuvo al reducir los niveles de autofagia a través de la deficiencia selectiva de *atg5* y *atg7* en neuronas [63,64]. En lo que respecta al rol de la autofagia en el envejecimiento, la pérdida de la función de Atg1, Atg7, Atg18 y beclina 1 reduce la longevidad de *C.elegans* [65]. Además, se sabe que durante el envejecimiento, la expresión cerebral de Atg5, Atg7 y beclina 1 se encuentran disminuidas. La primera evidencia sugiriendo que un incremento en la autofagia podía extender la vida, surgió a partir del descubrimiento de que la restricción calórica incrementa la longevidad en varios modelos y que la abolición de la autofagia elimina el efecto de la misma [66]. El análisis de los genes que se encuentran sobre-regulados durante la restricción calórica arrojó que la lipasa LIPL-4, participa en el mecanismo de extensión de longevidad al activar la respuesta autofágica a través de la producción de ácidos grasos poli-insaturados Ω -6. Los cuales, inducen la autofagia e incrementan la longevidad en condiciones que no recapitulan la restricción calórica [67]. De tal manera que la evidencia sugiere que la autofagia juega un rol fundamental en el entendimiento del proceso de envejecimiento y en la extensión de la vida.

I.1.5.2 Sistema de degradación ubiquitina-proteasoma (UPS)

El sistema de degradación ubiquitina-proteasoma (UPS) es un sistema proteolítico en el citosol de las células eucariotas. La degradación por el UPS se inicia cuando la proteína sustrato se conjuga con ubiquitina, que es un polipéptido de 76 aminoácidos altamente conservado. La conjugación de la ubiquitina se logra a través de un mecanismo enzimático secuencial que involucra 3 clases de enzimas. Primero, la enzima activadora de ubiquitina (E1), activa un residuo de glicina del extremo carboxi-terminal de la ubiquitina a través de un mecanismo dependiente de ATP. La ubiquitina activada se transfiere posteriormente a la enzima conjugadora de ubiquitina (E2). En el tercer paso, la ubiquitina ligasa (E3) une la ubiquitina de la enzima E2 a un residuo de lisina de la proteína blanco. Existen múltiples tipos de E3, que reconocen distintos motivos proteicos, por lo que son las responsables de la selectividad en el proceso. La misma cascada une moléculas adicionales de ubiquitina a la ubiquitina primaria, formando una cadena de ubiquitina. Después de la ubiquitinación, las proteínas son reconocidas y degradadas por el proteasoma. Los proteasomas activos se forman por la interacción de partículas regulatorias proteasomales (19S) con una partícula central (20S), que contiene los sitios activos. Las partículas 20S se encuentran normalmente libres dentro de la célula, en un estado inactivo. Para su activación, la partícula 19S se ensambla con la 20S, lo cual permite el reconocimiento del sustrato poli-ubiquitinizado, remueve las ubiquitinas y despliega el sustrato para translocarlo a la cámara proteolítica. Finalmente, el sustrato se degrada en pequeños péptidos [68].

Existe relación entre una disminución en la función del proteasoma y los desórdenes del plegamiento de proteínas [69,70]. Por ejemplo, al atenuar farmacológicamente la función proteasomal en ratas adultas, éstas desarrollaron síntomas Parkinsonianos y degeneración de la sustancia nigra pars compacta [71]. En el caso de la enfermedad autosómica de Parkinson, las

mutaciones en el gen que codifica para una enzima E3 (Parkin), generan la acumulación de proteínas dañadas y como consecuencia final, daño neuronal [72,73]. En un modelo celular que expresa la forma trunca de la proteína tau, la reducción de la actividad proteasomal incrementó la agregación proteica y al activarla farmacológicamente, fue posible acelerar la degradación de los agregados [74]. Ya que una actividad proteasomal óptima es crucial para la homeostasis celular, el proteasoma es un blanco importante en los desórdenes del plegamiento de proteínas.

Se ha sugerido también que una actividad proteasomal disminuida podría eventualmente promover la agregación de más proteínas, generando toxicidad celular [75]. La generación de modelos animales transgénicos con defectos en la actividad proteasomal, es extremadamente difícil, debido a la función fundamental del proteasoma. Sin embargo, bajo la inactivación condicional de algunas de sus subunidades en neuronas de la sustancia nigra, se observó la acumulación de depósitos de α -sinucleína [76]. Una limitación del proteasoma para la remoción de agregados proteicos, es el tamaño de los mismos, así como su resistencia a la digestión. La cámara central del proteasoma tiene un tamaño de 13 angstroms. En un estudio reciente se demostró que los agregados proteicos pueden bloquear la entrada a la cámara central del proteasoma, disminuyendo su actividad y ocasionando efectos devastadores para la proteostasis celular [77–80].

I.1.5.2.1 Estructura

El proteasoma eucariota es un complejo proteico multicatalítico en forma de barril, compuesto por la subunidad catalítica 20S y dos partículas reguladoras 19S, necesarias para su actividad. La subunidad 20S está formada por 4 anillos heptaméricos apilados. Los anillos exteriores están compuestos por 7 subunidades α distintas que son proteolíticamente inactivas. Mientras que los anillos exteriores contienen los sitios activos y se encuentran formados por siete subunidades β

distintas, de las cuales únicamente $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 5$ poseen actividad catalítica hacia diferentes sustratos. Las subunidades α se necesitan para el ensamblaje apropiado de las subunidades β y sirven además como acceso para las cámaras internas (**Figura 2**) [81].

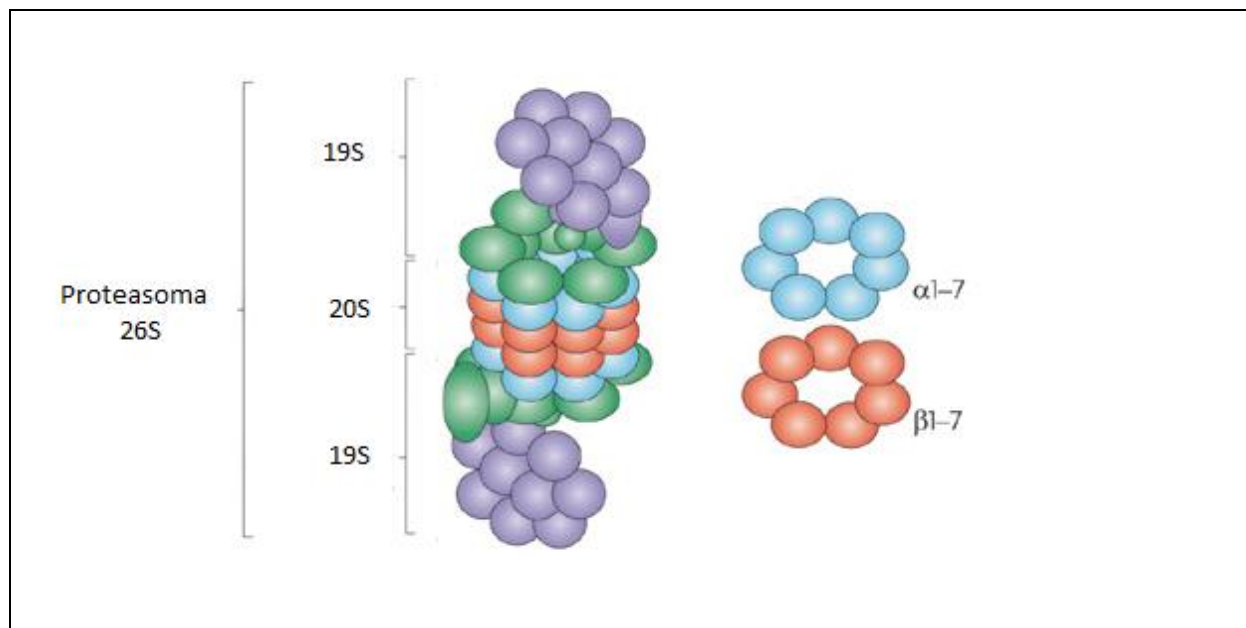


Figura 2. Estructura del proteasoma eucariota. Modificado de [81].

1.1.5.2.2 Actividad proteolítica

Los proteasomas de los organismos eucariotas poseen tres actividades proteolíticas que digieren distintos sustratos. La subunidad $\beta 5$ (actividad tipo quimiotripsina) rompe el extremo carboxilo adyacente a aminoácidos hidrofóbicos, la subunidad $\beta 2$ (actividad tipo tripsina) en sitios adyacentes a aminoácidos básicos y la subunidad $\beta 1$ (tipo caspasa) en sitios adyacentes a aminoácidos ácidos [82]. Los proteasomas son responsables de la depuración de proteínas dañadas, plegadas anormalmente o desnaturalizadas, así como de la degradación de proteínas de vida corta y agregados proteicos [81]. También juegan un rol en la regulación de los procesos de replicación, división celular, transcripción, etc.

I.1.5.2.3 Apertura

La partícula 20S en eucariotas, existe en un estado de auto-inhibición, debido a elementos estructurales del dominio amino-terminal (N-terminal) de las subunidades α . Para permitir la apertura y acceso a la cámara proteolítica, el proteasoma debe interactuar con un complejo regulatorio de tipo ATPasa. Las proteínas destinadas para la degradación proteasomal son marcadas con una cola de ubiquitina que sirve como señal de reconocimiento por parte de la partícula reguladora 19S. Posteriormente las subunidades con función de ATPasa despliegan el sustrato y lo pasan al centro proteolítico de la subunidad 20S donde es degradado en péptidos pequeños [83].

I.1.5.2.4 Proteasoma y envejecimiento

El funcionamiento incorrecto y disminución de la actividad proteasomal han sido relacionados con el envejecimiento [27,84,85], pues se ve afectada la capacidad de remover proteínas dañadas y favorece el desarrollo de enfermedades. Por ejemplo, un modelo de ratón transgénico con disminución en la actividad tipo quimiotripsina del proteasoma presentó una reducción en su expectativa de vida así como signos prematuros de envejecimiento [86]. Otro ejemplo que relaciona la actividad proteasomal con el envejecimiento es el caso de *Heterocephalus glaber*, un roedor con longevidad extraordinaria (aproximadamente 30 años). Los estudios indican que este animal presenta un incremento de tres a seis veces en la actividad proteasomal, promoviendo una degradación efectiva de proteínas dañadas [87]. Adicionalmente, el proteasoma puede ser activado por manipulación genética así como por factores que afectan su conformación, estabilidad o la expresión de sus subunidades. La expresión ectópica de la subunidad Rpn11 de la partícula reguladora 19S en *Drosophila melanogaster*, demostró mantener la integridad proteasomal y

suprimir la toxicidad de agregados de poliglutamina, además de extender la longevidad al ser expresada durante etapas de la vida adulta [26]. Un resultado similar se observó al sobreexpresar la subunidad Rpn6 en *C. elegans*. Mientras que al silenciarla se observó el efecto contrario [27]. Por lo tanto, preservar una actividad proteasomal óptima durante el envejecimiento pudiera ser una estrategia interesante para prolongar la vida y prevenir el desarrollo de enfermedades.

I.1.5.2.5 Proteasoma arqueano

El proteasoma 20S de las arqueas es el precursor evolutivo del proteasoma eucariota. Es similar en estructura, número de subunidades y mecanismo catalítico. Consiste de 4 anillos heptaméricos apilados, formados por subunidades α y β idénticas, siendo todas las subunidades β proteolíticamente activas y de amplia especificidad [88]. En las arqueas, las subunidades α se ensamblan espontáneamente para formar los anillos heptaméricos que servirán como base para la formación de los anillos conformados por las subunidades β [89].

El proteasoma de la arquea *Thermoplasma acidophilum* ha sido caracterizado, las 7 subunidades α y β son idénticas [90]. La falta de diversidad de las subunidades β tiene una implicación importante, pues significa que los sitios activos en la cámara central son más numerosos que sus contrapartes eucariotas (en los que las 7 subunidades β son distintas y solo 3 presentan actividad proteolítica), resultando en 6 sitios activos (3 por cada anillo heptamérico). En arqueas como *Thermoplasma acidophilum* existen 14 sitios activos [89,91]. Los proteasomas de arqueas generalmente presentan actividad tipo quimiotripsina, sin embargo para el caso de *Thermoplasma acidophilum* se han reportado las 3 actividades proteolíticas [91].

A pesar de que la estructura, enzimología y bioquímica de los proteasomas eucariotas y procariotas es muy similar, el mecanismo por el cual las proteínas son seleccionadas para su degradación

parece ser diferente. El proteasoma de las arqueas no posee el sistema de reconocimiento de ubiquitina. Los residuos N-terminal de la subunidad α se encuentran estructuralmente desordenados y hay datos bioquímicos que indican que algunos péptidos pueden tener acceso a la cámara interior incluso en la ausencia de un activador de tipo ATPasa [89,91,92], sugiriendo que los proteasomas arqueanos autolimitan el acceso del sustrato de una forma dinámica.

El proteasoma eucariota es capaz de acelerar la degradación de proteínas propensas a la agregación de manera selectiva y con una mayor eficiencia que el proteasoma eucariota [92,93]. En un estudio se demostró que el proteasoma arqueano promueve la degradación de diversas proteínas con tendencia a la agregación proteica, entre ellas se encuentran una forma mutante de superóxido dismutasa 1 (SOD1), seis isoformas de tau y el receptor de andrógenos con una región de poliglutamina [93].

La evidencia anterior sugiere que es posible que la expresión del proteasoma arqueano *in vivo*, pueda utilizarse como herramienta para degradar las proteínas dañadas y agregadas generadas durante el proceso de envejecimiento, proporcionando un sistema complementario y probablemente más eficiente al intrínseco, permitiendo un decremento en el envejecimiento biológico y cronológico.

I.1.6 Modelos experimentales para el estudio del envejecimiento

El uso de humanos como sujetos para estudios de envejecimiento es complicado debido a cuestiones éticas, la larga longevidad, influencias ambientales, etc. Es por eso que se han desarrollado diversos modelos para estudiar la biología del proceso de envejecimiento. Los más utilizados son *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* y

Mus musculus. En este trabajo se utilizaron los modelos de *Caenorhabditis elegans* y *Mus musculus*, los cuales se describen a continuación.

I.1.6.1 Caenorhabditis elegans

En 1965, Sydney Brenner estableció a *C. elegans* como organismo modelo. Es un nemátodo no-parásito miembro del phylum Nematoda, no segmentado con un cuerpo cilíndrico. Una gran cantidad de características hacen de *C. elegans* un modelo particularmente ventajoso para estudios de envejecimiento. Su periodo de vida es de aproximadamente 15 días, por lo que los experimentos pueden ser concretados en un tiempo relativamente corto. Su ciclo de vida está formado por 4 etapas larvarias (L1, L2, L3 y L4) y una fase adulta. Los parámetros para medir su envejecimiento biológico y cronológico están caracterizados [94]. Es pequeño (1 mm en la fase adulta), por lo cual un gran número de animales pueden ser criados y manipulados en el laboratorio. Es un organismo que está formado por 959 células y es transparente en todas las etapas de su vida por lo cual es posible visualizar su interior por microscopía. El genoma es pequeño y está totalmente secuenciado. *C. elegans* es hermafrodita con fertilización interna, lo que significa que tolera homocigocidad total, por lo que es posible obtener cepas isogénicas y además es posible cruzar hermafroditas con machos. El gusano es extremadamente resistente a enfermedades genéticas y bajo las condiciones en las que se cultiva en el laboratorio no necesita moverse para alimentarse o reproducirse. Los gusanos pueden ser conservados en nitrógeno líquido de tal forma que pueden reservarse para uso futuro sin generar casi ningún costo [95].

I.1.6.2 Fibroblastos embriónicos murinos

Los cultivos primarios de fibroblastos embriónicos murinos (FEMs) son un modelo validado y aceptado para el estudio del envejecimiento y la senescencia replicativa en células de mamífero,

debido a que poseen una capacidad proliferativa finita que se correlaciona directamente con la edad del organismo donante. Adicionalmente el estudio de células en cultivo permite tener un ambiente controlado para el análisis de una variedad de procesos y mecanismos. La desventaja radica en el aislamiento de las células de posibles elementos regulatorios presentes *in vivo*, tales como interacciones célula – célula, célula – matriz, arquitectura tisular, suplemento apropiado de oxígeno [96,97], etc.

La senescencia replicativa se define como una pérdida estable e irreversible de la capacidad proliferativa acompañada de distintos cambios bioquímicos y fenotípicos que se utilizan como biomarcadores para identificar a las células envejecidas y senescentes. Entre estos marcadores se encuentran [97]:

- a) Cuantificación de las duplicaciones de la población celular durante el proceso de cultivo. Las duplicaciones de población se definen como el número de veces que las células se duplican. Lo anterior se basa en la observación de que durante el envejecimiento celular, el potencial proliferativo disminuye. Generalmente, se calcula al registrar el número inicial de células y su conteo después de un intervalo de tiempo definido.
- b) Cambios morfológicos, que incluyen un incremento en el tamaño celular, tamaño nuclear, número de células multinucleadas, número incrementado de vacuolas, etc.
- c) Disminución de la capacidad proliferativa, que puede medirse con el ensayo de incorporación de 5-bromodeoxiuridina, que es un análogo de la timidina. Una reducción en la incorporación de esta sustancia es indicativa de una menor proliferación celular.

I.1.6.3 Mus musculus

El ratón es un modelo mamífero con una longevidad corta, similar en fisiología y función celular a los humanos. Los sistemas músculo-esquelético, inmune, endócrino y digestivo de ratones y

humanos son similares en función y arquitectura. Los cambios relacionados con el envejecimiento en la función cardíaca y hepática han sido modelados en ratón. A pesar de que el cerebro del ratón es menos complejo que el humano, existen muchas similitudes entre los sistemas nerviosos de ambas especies. El ratón es un buen modelo pues combina la complejidad de un sistema de mamífero con un bajo costo de manutención y una longevidad corta (1.5 a 2 años en promedio) [98]. Adicionalmente, debido a su reducida expectativa de vida es posible llevar a cabo estudios longitudinales y analizar tejidos en distintas etapas del envejecimiento. A pesar de las ventajas del ratón como modelo, existen diferencias importantes con respecto a los humanos, por ejemplo, los ratones poseen telómeros largos y una alta actividad de la enzima telomerasa. Ellos pueden sintetizar vitamina C, pero los humanos no. Los ratones no desarrollan todas las enfermedades típicamente asociadas con el envejecimiento en humanos, por ejemplo, enfermedades cardiovasculares o enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, los ratones exhiben una disminución cognitiva y de memoria que emula los cambios observados en seres humanos [4,99].

I.2 JUSTIFICACIÓN

Las proyecciones indican que en 40 años la población mayor de 60 años se triplicará. El proceso de envejecimiento no sólo conlleva a una disminución en la calidad de vida, sino que además incrementa el riesgo de aparición de diversas enfermedades. Por lo tanto, al entender la naturaleza del proceso de envejecimiento será posible extender la salud y los años de vida activa.

El colapso en la proteostasis y la acumulación de proteínas insolubles han sido reportados en diversos modelos experimentales durante el envejecimiento. Sin embargo, hasta el momento no se ha determinado si se trata de agregados proteicos, ni se ha realizado una caracterización detallada de los mismos. Así mismo no se ha determinado la contribución de la agregación proteica en el envejecimiento. En este estudio se propone que la acumulación de proteínas con conformaciones alteradas y la consecuente formación de agregados entre ellas juegan un rol en el proceso del envejecimiento. El impacto no se limita al entendimiento del proceso del envejecimiento, ya que además puede abrir la puerta para la generación de nuevas terapias cuyo objetivo sea el prevenir el daño fisiológico generado durante dicho proceso.

I.3 HIPÓTESIS

Durante el envejecimiento existe una acumulación progresiva de agregados proteicos de tipo amiloide y estos juegan un rol en el proceso de envejecimiento.

I.4 OBJETIVOS

I.4.1 Objetivo general

Analizar la agregación de proteínas en el proceso de envejecimiento en los modelos *Caenorhabditis elegans* y *Mus musculus*.

I.4.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar los agregados proteicos generados durante el envejecimiento en los modelos *Caenorhabditis elegans*, FEMs y *Mus musculus*.
2. Inhibir farmacológicamente la agregación proteica como estrategia para retrasar el envejecimiento en *Caenorhabditis elegans*.
3. Manipular la proteostasis en *Caenorhabditis elegans* como estrategia para alterar el envejecimiento.

CAPÍTULO II. Parte experimental

II.1 Caracterización de los agregados proteicos generados durante el envejecimiento en los modelos *Caenorhabditis elegans*, FEMs y *Mus musculus*

La caracterización se realizó usando una batería de métodos establecidos para el análisis de la agregación proteica. A continuación, se presenta el esquema metodológico.

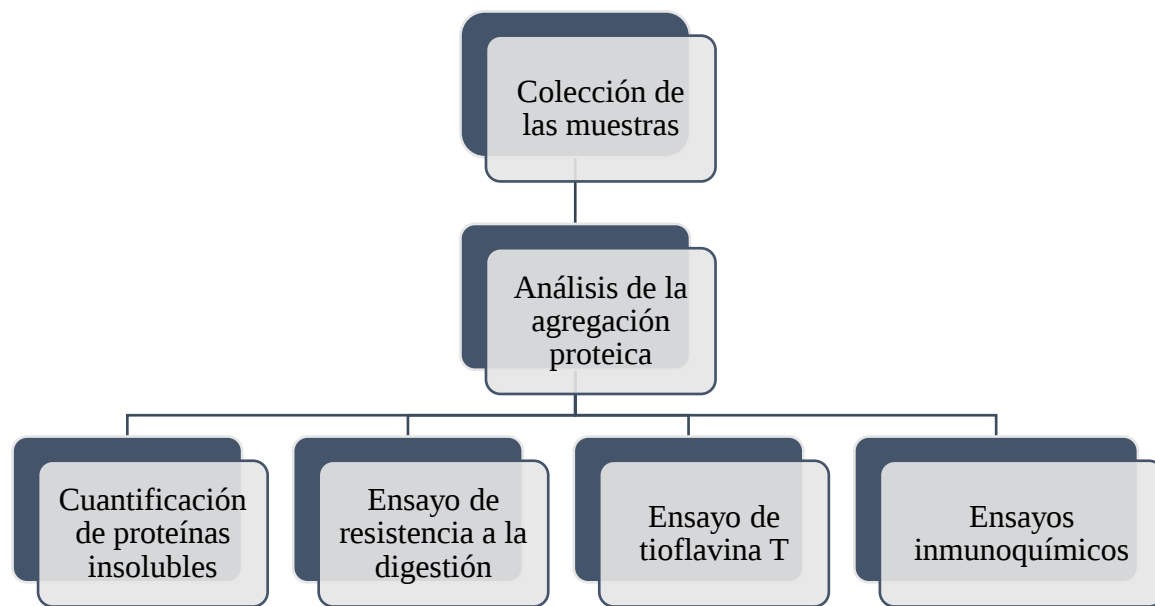


Figura 3. Esquema metodológico utilizado para la caracterización de los agregados proteicos durante el envejecimiento en los modelos seleccionados.

II.1.1 Grupos experimentales

II.1.1.1 Cultivo y colección de *Caenorhabditis elegans*

Para los experimentos realizados en *C. elegans* se colectaron 3 grupos de edad a los días 1, 5 y 10 de vida adulta. Se utilizó la cepa CF512 que posee una mutación sensible a la temperatura la cual inhabilita su reproducción a 25 °C. La cepa fue obtenida a través del *Caenorhabditis Genetics*

Center (CGC), University of Minnesota (<http://www.cbs.umn.edu/CGC/>) y mantenida a 25 °C en placas Petri de 100 mm, con medio de crecimiento de nemátodos (NGM, *nematode growth medium*) en presencia de *Escherichia coli* OP50. Para obtener los cultivos sincronizados, se extrajeron huevecillos fertilizados de hermafroditas grávidas utilizando solución de lisis. Una vez que los adultos fueron lisados, los huevecillos se lavaron en solución amortiguadora M9 y se les permitió eclosionar durante toda la noche en medio S. Al siguiente día, los nemátodos se colocaron en platos con medio NGM y *Escherichia coli* OP50. Esta cepa de *E. coli* es un auxótrofo que solo puede proliferar en presencia de uracilo, lo cual permite controlar su crecimiento en medio NGM, dicha característica es necesaria pues facilita la observación de los nemátodos [100]. Los nemátodos fueron transferidos cada tercer día a platos frescos hasta el momento de su colección. La colección se realizó usando 10 ml de agua destilada (dH₂O) por plato y la suspensión obtenida fue centrifugada 3 veces a 1500 rpm por 1 min para remover los residuos bacterianos adheridos al exterior de los nemátodos. Posteriormente los nemátodos colectados se colocaron en 10 ml de dH₂O en agitación suave para remover las bacterias presentes en el sistema digestivo. Las muestras colectadas fueron congeladas y almacenadas a -80 °C hasta el momento de su análisis.

II.1.1.2 Cultivo y colección de FEMs

Para los experimentos realizados en fibroblastos de embrión murinos (FEMs) se colectaron muestras a las poblaciones duplicadas 3 y 8. Los cultivos primarios de FEMs fueron obtenidos siguiendo un protocolo reportado previamente [101]. Brevemente, se sacrificó una hembra preñada tipo silvestre al día 14 post-coito, se extrajeron los embriones de la cavidad uterina, la cabeza y órganos fueron removidos y lavados en amortiguador salino de fosfatos (PBS, HyClone). Posteriormente el tejido fue triturado utilizando un bisturí y digerido por 15 minutos a 37 °C con 1 ml de tripsina 0.05% (Invitrogen) y 100,000 unidades de DNasa I (Thermo Fisher) por embrión.

Las células obtenidas fueron disociadas con una pipeta, la tripsina fue inactivada con medio de cultivo para FEMs y la suspensión se centrifugó a 300 g por 5 min. La pastilla se colectó y resuspendió en medio para FEMs, las células se sembraron en platos para cultivo celular de 150 mm (Denville) pre-tratados con gelatina 0.2%. Los fibroblastos son las únicas células que tienen la capacidad de adherirse a los platos pretratados. Una vez alcanzada una confluencia del 70-80% se realizaron pasajes secuenciales a una dilución 1:4. Las muestras colectadas fueron congeladas y almacenadas a -80 °C hasta el momento de su análisis.

II.1.1.3 Mus musculus

Los ratones fueron proporcionados por el bioterio de la Universidad de Texas, donde los animales se mantuvieron en condiciones estándar y bajo la dieta PicoLab Rodent 20 (*Labdiet*) hasta el momento de su sacrificio. Para los experimentos realizados en ratón se colectaron muestras de cerebro, corazón, hígado e intestino de ratones tipo silvestre (cepas B6C3 y C57BL6) de 3 grupos de edad: 3 meses, 12 meses y 24-27 meses. Los animales fueron perfundidos y las muestras fueron congeladas y almacenadas a -80 °C hasta el momento de su análisis.

II.1.2 Preparación de homogeneizados totales

II.1.2.1 Caenorhabditis elegans

Las muestras de *C. elegans* fueron procesadas en un homogeneizador *Precellys 24* (Bertin instruments) en presencia de microesferas de vidrio de 0.5 mm y solución amortiguadora con inhibidor de proteasas (CompleteMini, Roche). Se utilizó el programa de homogeneización a 5000 rpm por 15 segundos, 4 ciclos. Los restos no homogeneizados fueron removidos al centrifugar las muestras a 450 xg por 5 minutos a 4 °C. Se determinó la concentración de proteínas por medio del

método del ácido bicinconínico utilizando el sistema comercial Pierce MicroBCA Protein Assay Kit (ThermoFisher), midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro a 562 nm.

II.1.2.2 FEMs

Las muestras de FEMs fueron homogeneizadas utilizando un homogeneizador con micropistilo en presencia de solución amortiguadora con inhibidor de proteasas (CompleteMini, Roche). Los restos no homogeneizados fueron removidos al centrifugar las muestras a 450 g por 5 minutos a 4 °C. Se determinó la concentración de proteínas por medio del método del ácido bicinconínico utilizando el sistema comercial Pierce MicroBCA Protein Assay Kit (ThermoFisher), midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro a 562 nm.

II.1.2.3 Mus musculus

Las muestras de cerebro de ratón fueron homogeneizadas manualmente con un homogeneizador Dounce en presencia de solución amortiguadora con inhibidor de proteasas (CompleteMini, Roche). Las muestras de corazón, hígado e intestino fueron procesadas en un homogeneizador *Precellys 24* (Bertin instruments) en presencia de microesferas de metal de 2.8 mm y tampón acuoso con inhibidor de proteasas (CompleteMini, Roche). Se utilizaron 4 ciclos de homogeneización a 5000 rpm por 20 segundos. Los restos no homogeneizados fueron removidos al centrifugar las muestras a 450 g por 5 minutos a 4 °C. Se determinó la concentración de proteínas por medio del método del ácido bicinconínico utilizando el sistema comercial Pierce MicroBCA Protein Assay Kit (ThermoFisher), midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro a 562 nm.

II.1.3 Caracterización de la senescencia en FEMs

II.1.3.1 Poblaciones duplicadas (PD)

Para el cálculo del número de PD se determinó el número total de células después de cada pasaje usando una cámara de Neubauer y se aplicó la siguiente fórmula [102]:

$$\Delta PD = \log(nh/ni)/\log 2$$

Donde, nh es el número final de células en cada pasaje y ni es el número inicial de células.

II.1.3.2 Tinción de faloidina

Para visualizar y cuantificar el tamaño celular, se utilizó la tinción de faloidina, que es un péptido bicíclico que se une selectivamente a la F-actina. Las células fueron fijadas por 5 minutos en paraformaldehído al 4%. Para realizar la tinción se utilizó el sistema comercial ActinGreen 488 Ready Probes (ThermoFisher), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron montadas usando el medio de montaje Vectashield (Vector Labs) que contiene DAPI para contrateñir los núcleos. Las imágenes de las células fueron obtenidas con un microscopio de fluorescencia Leica DMI 6000B. La cuantificación se realizó con el programa Image J (RSB, Reserve Services Branch, NIH).

II.1.3.3 Ensayo de incorporación de 5-bromodeoxiuridina (BrdU)

Las células fueron tratadas por 24 horas con una solución 10 μ M de 5-bromodeoxiuridina (Sigma) y fueron fijadas por 20 minutos en solución de Bouin (Sigma) e incubadas toda la noche con el anticuerpo primario anti-bromodeoxiuridina (Developmental studies hybridoma bank) dilución 1:100 en solución Tris-Carragenina-Tritón X-100 (TCT). Posteriormente se incubaron por 1 hora con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a Alexa Flour 594 (Life technologies) dilución 1:500 en solución TCT. Las muestras fueron montadas y los núcleos contrateñidos usando el medio

de montaje Vectashield con DAPI (Vector Labs). Las imágenes de las células fueron obtenidas con un microscopio de fluorescencia Leica DMI 6000B. La cuantificación se realizó con el programa Image J.

II.1.4 Extracción y cuantificación de proteínas insolubles

Los homogeneizados se sometieron a centrifugaciones seriales con el objetivo de coleccionar las fracciones proteicas insolubles en detergente y analizarlas. La concentración inicial de proteína total de las muestras fue estandarizada a 2 mg/ml por el método del ácido bicinonínico utilizando el sistema comercial Pierce MicroBCA Protein Assay Kit (ThermoFisher). Las muestras fueron tratadas con benzonasa (Sigma) a una concentración de 65 unidades/ml de muestra y lipasa A (Sigma) a una concentración de 1.35 unidades/mg de proteína, e incubadas a 37 °C por 1 hora. Para la extracción de las proteínas insolubles, las muestras fueron sometidas a 4 centrifugaciones a 20,000 x *g* por 1 hora a 4 °C; la primera en presencia de solución amortiguadora, la segunda en amortiguador a manera de lavado, la tercera en amortiguador con detergente (0.1% dodecilsulfato de sodio, 1% desoxicolato de sodio y 1% Igepal) y la cuarta en amortiguador acuoso (20 mM TRIS, 100 mM NaCl) a manera de lavado. La fracción insoluble obtenida se resuspendió en solución amortiguadora y se sonicó por 10 minutos a 100% A (amplitud) para posteriormente realizar la cuantificación proteica, que se realizó por el método del ácido bicinonínico utilizando el sistema comercial Pierce MicroBCA Protein Assay Kit (ThermoFisher). El porcentaje de proteína presente en la fracción insoluble se calculó tomando en cuenta la cantidad inicial de proteína presente en los homogeneizados totales.

Para la electroforesis SDS-PAGE de las muestras de ratón, los homogeneizados totales (diluidos 1:3) y las fracciones insolubles se sometieron a un proceso de desnaturalización a 100 °C por 10

minutos en presencia del amortiguador de muestra NuPAGE LDS 1X (ThermoFisher) y ditioneitol (DTT) 50 mM. La electroforesis se realizó en geles BIS-TRIS 4-12 % (Bolt, ThermoFisher) por 30 min a 200V (PowerPac HC Power Supply, BioRad) en amortiguador NuPAGE MES SDS (ThermoFisher). Los geles se tiñeron por 1 hora en solución de Coomassie y posteriormente se destiñeron con una solución de ácido acético glacial, agua y metanol. Las imágenes fueron obtenidas con el escáner CanoScan8800F (Canon).

II.1.5 Ensayo de tioflavina T

La fracción de proteínas insolubles se obtuvo siguiendo el procedimiento descrito en la sección *Extracción y cuantificación de proteínas insolubles*, con la diferencia que la fracción insoluble obtenida se sonicó por 2 minutos a 30% A (amplitud). Las lecturas de fluorescencia se llevaron a cabo a temperatura ambiente en presencia de una solución 5 μ M de tioflavina T (Sigma) a una excitación de 435 nm y emisión de 485 nm, utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia Hitachi F7000. Para determinar que la señal observada proviene de la unión de la tioflavina T a proteínas, y no de unión inespecífica, se realizó un tratamiento de las muestras con 1 mg/ml de proteinasa K (PK, Sigma) por una hora a 37 °C, la digestión se detuvo utilizando fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 5 mM y la señal de fluorescencia se determinó bajo las condiciones indicadas anteriormente.

Para el análisis de los espectros de emisión de fluorescencia de 200 nm a 900 nm de las fracciones insolubles de muestras de ratón, las lecturas de fluorescencia se llevaron a cabo a temperatura ambiente en presencia de 5 μ M tioflavina T (Sigma) a una excitación de 435 nm, utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia Hitachi F7000.

II.1.6 Ensayo de resistencia a la digestión proteica

Para el análisis de la resistencia a la digestión proteica en muestras de *C. elegans* y *FEMs* se digirieron 19 µg de proteína del homogeneizado total de las muestras con 0.3 µg de Proteinasa K, por una hora a 37 °C. Posteriormente se realizó una electroforesis SDS-PAGE seguida por tinción de Coomassie.

La fracción de proteínas insolubles de muestras de cerebro, corazón, hígado e intestino de ratón, se obtuvo siguiendo el procedimiento descrito en la sección *Extracción y cuantificación de proteínas insolubles*, con la diferencia que la fracción insoluble obtenida se sonicó por 2 minutos a 30 A. Para la cuantificación de la resistencia a la digestión proteica en la fracción insoluble se utilizó el método de precipitación con metanol posterior a la digestión proteica. Brevemente, la fracción insoluble fue sometida a una digestión con PK (Sigma), a una proporción de 0.3 microgramos de PK por cada 20 microgramos de proteína insoluble. La digestión se llevó a cabo a 37 °C por una hora y fue detenida con PMSF 5 mM. Para precipitar la fracción digerida, las muestras se mezclaron con 4 volúmenes de metanol 100% y se incubaron a -80 °C por una hora. Posteriormente se centrifugaron a 12,000 x g por 10 minutos. La pastilla fue colectada, resuspendida y la cantidad de proteína no digerida fue determinada por el método del ácido bicinconínico utilizando el sistema comercial Pierce MicroBCA Protein Assay Kit (ThermoFisher).

II.1.7 Técnicas inmunoquímicas

II.1.7.1 *Caenorhabditis elegans*

Para la tinción de muestras de *C. elegans* se colectaron los nemátodos en amortiguador M9, se removieron las bacterias presentes en el exterior y el interior; posteriormente se llevó a cabo el

método de criofractura al colocar aproximadamente 1500 nemátodos en un portaobjetos y congelarlos en hielo seco por un periodo de 20 minutos. Se realizó la criofractura y las muestras fueron fijadas en formaldehído 4% por 30 minutos, una vez terminado este paso, las muestras se incubaron por 5 minutos en una solución 0.1 M de glicina. Finalmente, las muestras se lavaron 3 veces con amortiguador para anticuerpos y se bloquearon por 1 hora con 3% de albúmina de suero bovino.

Para la tinción con los anticuerpos conformacionales A11 y OC (Millipore), las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante una noche con los anticuerpos primarios (1:1000) y por 1 hora con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a Alexa Flour 594 (Life technologies). Las muestras fueron montadas y los núcleos contrateñidos usando el medio de montaje Vectashield con DAPI (Vector Labs). Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio de fluorescencia Leica DMI 6000B.

II.1.7.2 FEMs

Los FEMs fueron sembrados en cubreobjetos esterilizados de vidrio para microscopio (Denville), pretratados con gelatina al 0.2 %. Las células fueron fijadas por 5 minutos en paraformaldehído 4%. Para la tinción con los anticuerpos conformacionales A11 y OC (Millipore), las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante una noche con los anticuerpos primarios (1:1000) en solución Tris-Carragenina-Tritón X-100 (TCT). Posteriormente se incubaron por 1 hora con el anticuerpo secundario anti-conejo Alexa Flour 594 (Life technologies) en solución TCT. Las muestras fueron montadas usando el medio de montaje Vectashield con DAPI (Vector Labs). Las imágenes de las células fueron obtenidas con un microscopio de fluorescencia Leica DMI 6000B.

II.1.7.3 Dot blots

Se realizaron dot blots con los anticuerpos conformacionales A11 y OC (Millipore). Se colocaron 0.6 µg de proteína por muestra en una membrana de nitrocelulosa, que fue bloqueada con solución al 10% de leche sin grasa y TBST. Las membranas se incubaron a 4 °C por toda la noche con el anticuerpo primario (1:1000) diluido en una solución al 5% de leche sin grasa y TBST. Posteriormente las membranas se lavaron 3 veces por 10 minutos y se incubaron por una hora a temperatura ambiente con anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a peroxidasa (Sigma) en una solución al 5% de leche sin grasa. La detección se realizó con el reactivo de detección para western blot Amersham ECL (GE Healthcare), las imágenes fueron obtenidas con el sistema ChemiDoc (Biorad) y analizadas con el programa ImageJ.

II.2 Inhibición farmacológica de la agregación proteica como estrategia para retrasar el envejecimiento en *Caenorhabditis elegans*

Para el estudio de la inhibición farmacológica de la agregación proteica para alterar el envejecimiento en *C. elegans* se realizaron estudios en medio líquido y medio sólido. El esquema metodológico se presenta a continuación.

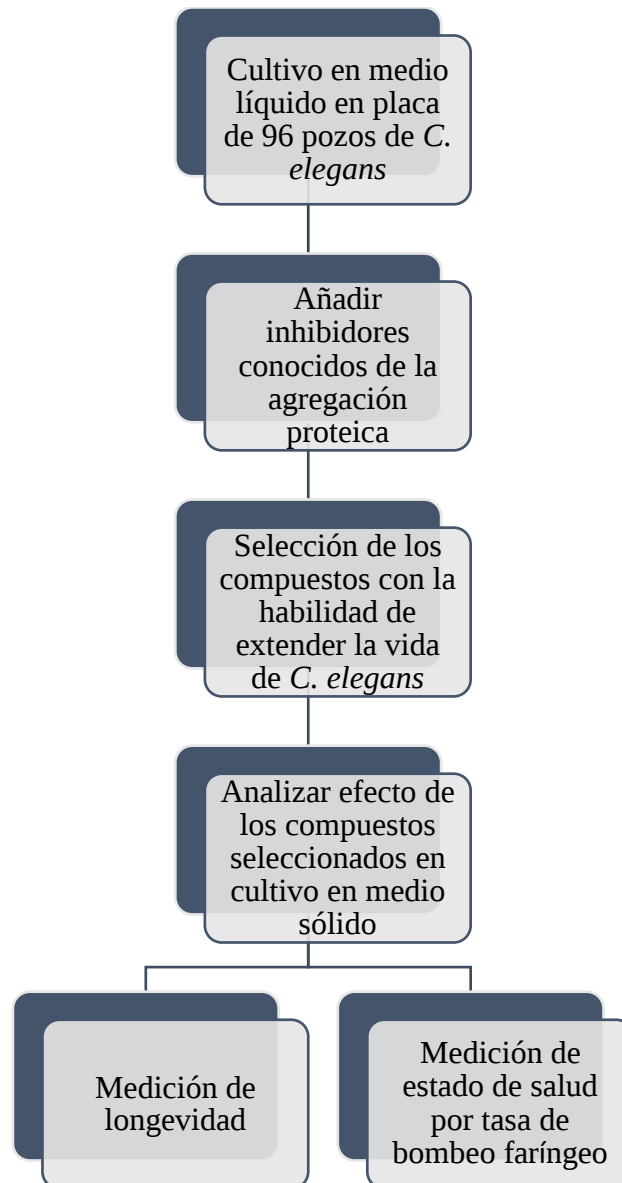


Figura 4. Esquema metodológico utilizado para el estudio de la inhibición farmacológica de la agregación proteica en *Caenorhabditis elegans*.

II.2.1 Cultivo y mantenimiento de *Caenorhabditis elegans*

Para este estudio se utilizó la cepa *C. elegans* N2 (cepa salvaje) que se obtuvo a través del *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC), de la Universidad de Minnesota (<http://www.cbs.umn.edu/CGC/>). Para el cultivo en medio líquido se utilizó un protocolo

reportado previamente [103]. Brevemente, se establecieron poblaciones sincronizadas al aislar huevecillos de hermafroditas grávidas utilizando la solución de lisis. Una vez que los adultos fueron disueltos, los huevecillos se lavaron en amortiguador M9 y se les permitió eclosionar durante toda la noche en medio S. La concentración de larvas eclosionadas se ajustó a 100 nemátodos por ml usando medio S en presencia de 25 µg/ml de estreptomicina y 6 mg/ml de *Escherichia coli* OP50. Posteriormente, en un plato de 96 pocillos con fondo transparente se colocaron 120 µl de dicha solución por pozo. Los nemátodos fueron incubados a 20 °C y una vez que alcanzaron la etapa larvaria L4 se esterilizaron con fluorodeoxiuridina 120 µM (FUdR).

Los cultivos en medio sólido se llevaron a cabo siguiendo una versión modificada de un protocolo previamente reportado [104]. Brevemente, se permitió que un grupo de adultos hermafroditas grávidos depositaran huevecillos por 2 horas en platos NGM con 25 µg/ml de estreptomicina y *E. coli* OP50. Posteriormente, los adultos fueron eliminados, dejando los huevecillos en el plato, los cuales se incubaron a 20 °C hasta su eclosión. Una vez que la etapa L4 fue alcanzada, se transfirieron (25 nemátodos por plato) a platos con NGM/estreptomicina/*E.coli*, 50 µM FUdR y los compuestos seleccionados.

II.2.2 Evaluación de compuestos inhibidores de la agregación en medio líquido

Los compuestos miricetina (Sigma), quinacrina (Santa Cruz Biotechnology), lacmoide (Sigma), rodanina (Sigma), negro clorazol (Sigma), ANSA (Sigma) y curcumina (Sigma) fueron pasados por un filtro de 20 µm y administrados desde el primer día de vida adulta a las concentraciones 7.5, 15, 30, 60, 120 y 240 µM; para el caso de la curcumina se utilizaron las concentraciones de 20 y 100 µM. Los experimentos fueron llevados a cabo en paralelo con los controles apropiados, que recibieron el mismo volumen que el solvente utilizado en los grupos tratados (**Tabla 1**).

Quinientos μg de *E. coli* OP50 fueron adicionados cada 5 días y la cubierta de los platos se removió periódicamente para permitir una oxigenación apropiada. Para los estudios de longevidad, se analizaron 30 nemátodos por condición utilizando un microscopio invertido Leica DMI6000 B. Los nemátodos que no mostraron movimiento durante el momento de la observación se consideraron como muertos.

Tabla 1. Compuestos y controles utilizados para la evaluación de inhibidores de la agregación en medio líquido.

Compuesto	Control
Miricetina	0.6% DMSO
Quinacrina	H ₂ O
ANSA	0.4% DMF
Negro clorazol	H ₂ O
Rodanina	H ₂ O
Lacmoide	0.78% etanol
Curcumina	0.1% DMSO

II.2.3 Evaluación de la longevidad y estado de salud en medio sólido

Se prepararon platos con medio NGM a los cuales se adicionaron soluciones prefiltradas de miricetina (120 μM , concentración final), quinacrina (7.5 μM , concentración final), ANSA (120 μM , concentración final) y curcumina (100 μM , concentración final). Los platos fueron almacenados en oscuridad a 4 °C hasta el momento de su uso. En paralelo, los grupos control recibieron el mismo volumen de solvente que los grupos tratados.

Los nemátodos se expusieron desde el primer día de vida adulta a los compuestos y fueron transferidos manualmente a platos frescos cada tercer día. Se monitoreó la longevidad de 100 nemátodos por grupo utilizando un microscopio de disección Leica MZ16F. Aquellos que no

mostraron movimiento o respuesta al toque con un alambre de platino se consideraron muertos. Los nematos que se localizaron fuera del medio de cultivo fueron excluidos del análisis.

Para el análisis del estado de salud se determinó la tasa de bombeo faríngeo al contar el número de contracciones en un intervalo de 30 segundos utilizando un microscopio de disección Leica MZ16F. Se analizaron grupos de 30 nemátodos por condición.

II.2.4 Análisis estadístico

Para crear las curvas de sobrevivencia se utilizó el análisis de Kaplan-Meier y se realizó la prueba de log-rank para determinar la significancia, en el programa GraphPad Prism 5.02. Para el análisis de los datos del estado de salud, se utilizó la prueba de T de student. Los análisis de sobrevivencia se realizaron con la plataforma OASIS2 (Online Application for Survival Analysis 2) [105]. La sobrevivencia promedio se calculó como el promedio de sobrevivencia de vida adulta. La sobrevivencia media se calculó como el tiempo en el cual la sobrevida fraccional equivale el 50%. La sobrevivencia máxima se calculó como el tiempo en el cual la sobrevida fraccional equivale al 10%.

II.3 Manipulación de la proteostasis en *Caenorhabditis elegans* como estrategia para alterar el envejecimiento

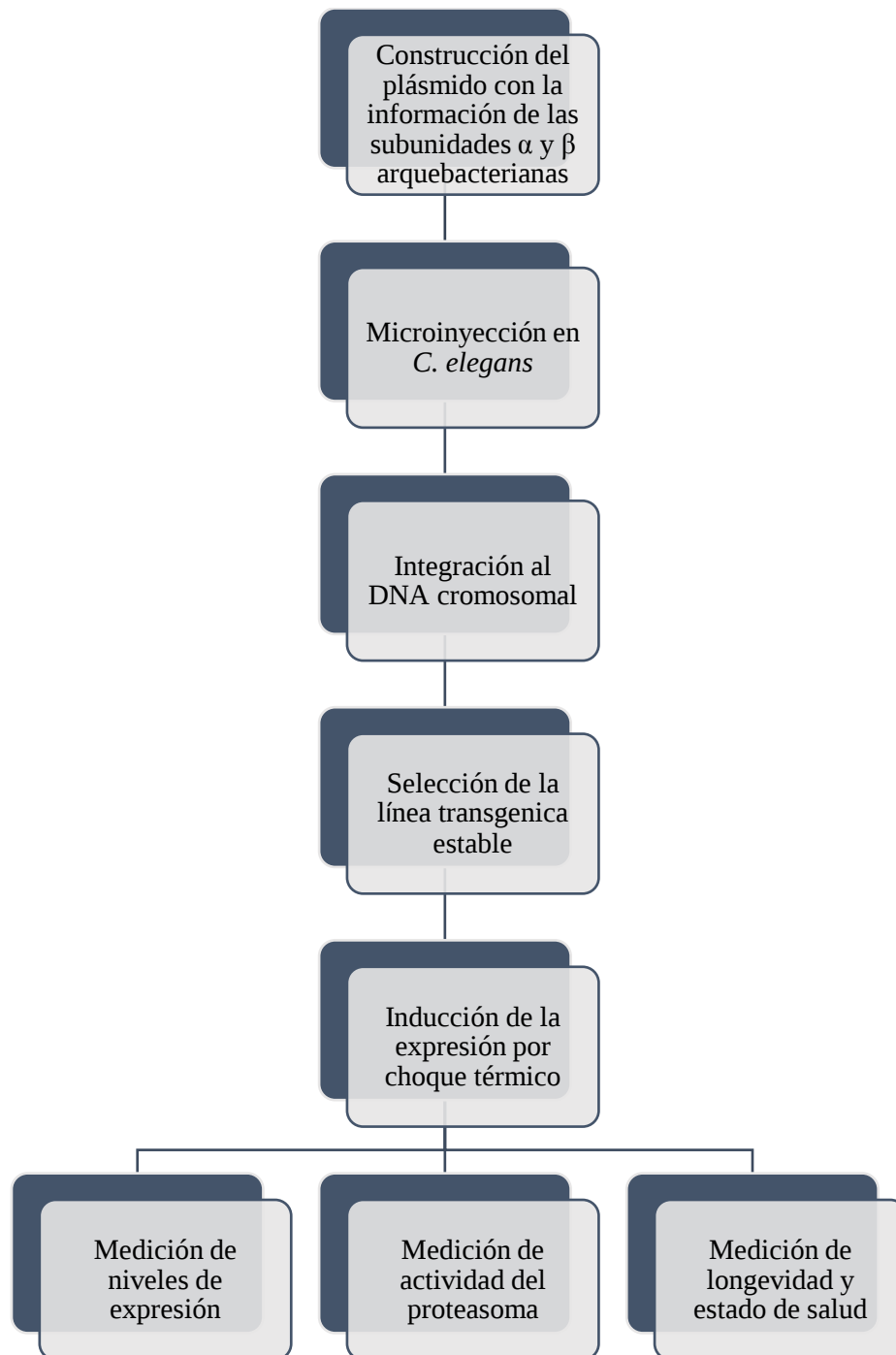


Figura 5. Esquema metodológico utilizado para la manipulación de la proteostasis en *Caenorhabditis elegans*.

II.3.1 Clonación y transformación

El plásmido pRSET5a que contiene los genes para las subunidades α y β del proteasoma de *Thermoplasma acidophilum* fue donado por el Dr. Wolfgang Baumeister. Se procedió a la transformación en *E.coli* DH5 α competentes, la selección de las colonias por su resistencia a la ampicilina y la extracción del DNA plasmídico usando el sistema comercial Spin MiniPrep de Quiagen. Se diseñaron los oligos con sitios de restricción de las enzimas BamHI y KpnI, para realizar la amplificación de las secuencias deseadas por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y su posterior inserción en el vector (**Tabla 2**). Adicionalmente a la subunidad α se le añadió una etiqueta de estreptavidina (strep-tag) y a la subunidad β una etiqueta de hemaglutinina. Para la expresión de las subunidades α y β en *C. elegans* se eligió el plásmido pCM1.57, que contiene un promotor inducible de choque térmico que permite controlar la expresión de la información al someter a los gusanos a temperaturas elevadas.

Tabla 2. Códigos de acceso en la base de datos de nucleótidos del NCBI para las subunidades α y β del proteasoma de *Thermoplasma acidophilum*. Se incluyen además las secuencias de los oligos diseñados (en verde el sitio de restricción para BamHI, en rojo el sitio de restricción para KpnI, en mayúsculas subrayada la secuencia de las etiquetas insertadas) y los ciclos seleccionados para la PCR. En la segunda columna se muestra que la secuencia inicial no contiene los sitios de restricción, que se añadieron posteriormente.

	Código NCBI	pb	Secuencia de los oligonucleótidos
α	X59507.1	726	5' gcgcgGGATCCatgcaacagggccagatgg
	BamHI: 0 sitios KpnI: 0 sitios Etiqueta de estreptavidina		3' gcgcgGGTACCtcaTTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAAgcgctga ggaatttttaacttctct
β	M83674.1	690	5' gcgcgGGATCCatgaatcagactttagaaactgg
	BamHI: 0 sitios KpnI: 0 sitios Etiqueta de hemaglutinina		3' gcgcgGGTACCttaAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAgcc AGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAcagaattaatccgagcttcctga
PCR: 1. 98 °C/ 1 minuto 2. 98 °C/ 10 segundos 3. 65 °C/ 30 segundos. 30 ciclos. 4. 72 °C/10 minutos.			

Los productos de PCR se purificaron usando electroforesis en un gel de agarosa 1% y se digirieron por 2 horas a 37 °C, al igual que el plásmido pCM1.57. Los productos digeridos se purificaron usando electroforesis y fueron ligados al plásmido incubando 1 hora a temperatura ambiente con la enzima T4 DNA ligasa. Bacterias *E. coli* DH5 α fueron transformadas con los productos de la ligación y las colonias fueron seleccionadas por su resistencia a la kanamicina. Se procedió a la extracción del DNA plasmídico y a la confirmación de los insertos usando las enzimas de restricción BamHI y KpnI. Así mismo, las muestras fueron enviadas a secuenciar y fueron analizadas con el programa de alineamiento Clustal W.

II.3.2 Microinyección

Se microinyectaron los plásmidos para la expresión de las subunidades α y β del proteasoma arqueano junto con un plásmido marcador de inyección (proteína verde fluorescente), en la gónada de adultos jóvenes de *C. elegans* cepa salvaje. La confirmación de que la microinyección fue exitosa se realizó al analizar la progenie en busca de nemátodos fluorescentes, indicando la presencia del arreglo extracromosomal. Adicionalmente se realizó la PCR utilizando un solo gusano (1. 94 °C/2 minutos, 2. 94 °C/30 segundos, 3. 55 °C/30 segundos, 4. 72 °C/60 segundos, 5. 72 °C/10 minutos, 30 ciclos) y western blot (al inducir un choque térmico por 1 hora a 33 °C) para confirmar la presencia y expresión de la información.

II.3.3 Integración

Para la integración se utilizó la progenie fluorescente (etapa larvaria L4) de los nemátodos microinyectados, se agregó trimetil psoralen a una concentración final de 50 $\mu\text{g/ml}$ y posteriormente los gusanos fueron irradiados con 350 mJ (x100) en un Stratalinker 1800 UV. Posteriormente se dejó a los gusanos reposar por 5 horas en un plato con *E. coli* OP50 y se seleccionaron 24 gusanos (P0) que fueron transferidos a 8 platos (3 gusanos por plato). Los P0 se transfirieron a platos frescos cada 24 horas por 3 días y de la progenie (F1) se seleccionaron 100 gusanos fluorescentes que fueron colocados individualmente en 100 platos. De la progenie de F1 se seleccionaron 2 gusanos fluorescentes (F2) por plato, y fueron colocados en 200 platos. Se llevó a cabo el análisis de la progenie de los mismos (F3) y se seleccionaron aquellas cepas en las que se observó el 100% de los gusanos fluorescentes, indicando una integración exitosa. Dichos gusanos fueron colocados en platos conteniendo iRNA para las etiquetas de estreptavidina/hemaglutinina y fueron apareados con nemátodos cepa salvaje por 5 generaciones

subsecuentes para eliminar posibles mutaciones indeseadas generadas durante el procedimiento. Las líneas generadas de esta manera fueron analizadas con PCR empleando un solo nemátodo y western blot (posterior a un choque térmico por 1 hora a 33 °C) para confirmar la presencia y expresión de la información.

II.3.4 Medición de niveles de expresión y actividad proteasomal

Se realizó PCR en tiempo real para medir los niveles de expresión de las subunidades α y β del proteasoma arqueano en los nemátodos transgénicos generados (línea 55) bajo distintas condiciones de inducción. Los tiempos y temperaturas de inducción seleccionados fueron los siguientes: 25 °C, 29 °C y 33 °C por 20, 40 y 60 minutos. A manera de control se utilizaron nemátodos línea 55 no expuestos a choque térmico. Posterior a la inducción, se purificó el ácido ribonucleico (RNA) de los nemátodos usando el sistema comercial RNeasy (Quiagen), para lo que previamente se homogeneizaron y digirieron con PK a una concentración final de 0.1 mg/ml por 30 minutos a 60 °C. Con el RNA purificado se realizó la PCR en tiempo real utilizando SYBR Green (Molecular Probes) para la detección y cuantificación de los productos amplificados.

Para medir los niveles de actividad proteasomal en *C. elegans* N2 y línea 55, se seleccionó el esquema de inducción de 33 °C por 60 minutos. A manera de controles se utilizaron nemátodos N2 y línea 55 no expuestos a choque térmico. Para evitar la contaminación transgeneracional, los nemátodos fueron cultivados en presencia de FUDR. Se utilizó el sistema comercial de cuantificación de actividad proteasomal ab107921 (Abcam), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los nemátodos fueron homogeneizados en amortiguador para preservar la actividad proteasomal y el homogeneizado resultante se centrifugó a 10,000 g por 15 minutos a 4 °C. La concentración de proteína total fue determinada por el método del ácido bicinconínico utilizando

el sistema Pierce MicroBCA (ThermoFisher). Se utilizaron 50 μ l de muestra a una concentración de proteína de 0.5 μ g/ μ l. Las mediciones se realizaron en paralelo con las muestras tratadas en ausencia y presencia de 100 μ M del inhibidor de actividad proteasomal MG132 a 37 °C. El sustrato utilizado fue Succ-LLVY-AMC a una concentración de 50 μ M. Las muestras fueron incubadas por una hora a 37 °C y la fluorescencia fue determinada a una excitación de 380 nm y emisión de 460 nm en un espectrofotómetro de fluorescencia Hitachi F7000.

CAPÍTULO III: Resultados

III.1 Caracterización de los agregados proteicos generados durante el envejecimiento en

Caenorhabditis elegans, FEMs y *Mus musculus*

Para cumplir con este objetivo se llevó a cabo un estudio en *Caenorhabditis elegans*, FEMs y *Mus musculus* (cerebro, corazón, hígado e intestino) con el propósito de analizar la aparición de agregados proteicos en el envejecimiento y realizar su caracterización.

Los agregados proteicos de tipo amiloide se caracterizan por ser insolubles en detergente, resistentes a la digestión con proteasas, unirse a tioflavina y a anticuerpos capaces de reconocer conformaciones comunes, por lo que esas técnicas fueron utilizadas para la caracterización de agregados generados durante el envejecimiento.

III.1.1 Caracterización de la senescencia en el modelo de FEMs

Para el análisis de la agregación, a diferencia de los modelos de *C. elegans* y *Mus musculus* en los que se seleccionaron 3 grupos de edad: (día 1, 5 y 10) y (2, 12 y 24-27 meses) respectivamente; para el modelo de FEMs, se seleccionaron dos grupos basados en el análisis del número de poblaciones duplicadas (PD), tamaño (tinción de faloidina) y proliferación celular (ensayo de 5-bromodeoxiuridina, BrdU), que son marcadores de senescencia (**Figura 6**). Los grupos seleccionados fueron aquellos pertenecientes a las PD 3 y 8 (**Figura 6**, panel A). El grupo PD 3 exhibe características propias de fibroblastos jóvenes, como una alta tasa de proliferación celular y un tamaño celular pequeño. Mientras que el grupo PD 8 presenta una disminución en la tasa de proliferación celular además de un incremento significativo en el tamaño celular, características asociadas con la senescencia en este modelo (**Figura 6**, paneles B y C) [96,97].

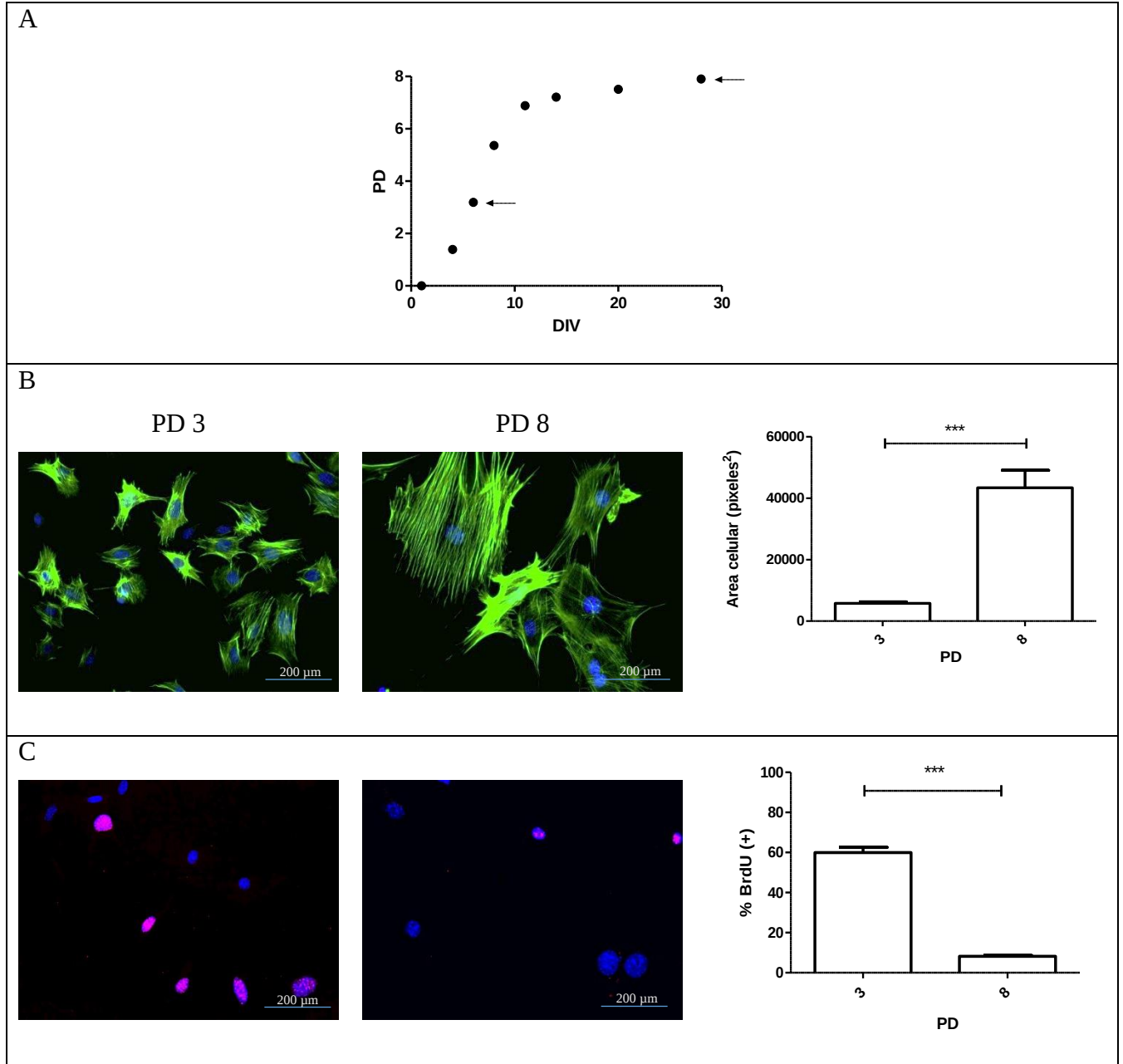


Figura 6. Caracterización de la senescencia en los grupos de FEMs usados en este estudio. A) Número de poblaciones duplicadas (PD) determinadas con la fórmula $\Delta PD = \log(nh/ni)/\log 2$. Donde, nh es el número final de células en cada pasaje y ni es el número inicial de células; los grupos seleccionados están marcados con una flecha; B) Tinción de faloidina (izquierda) y cuantificación del tamaño celular (derecha) de los grupos seleccionados DAPI (Azul), faloidina (verde), $n=30$ células; C) Ensayo de incorporación de 5-bromodeoxirudina (izquierda) y cuantificación de la proliferación celular (derecha) de los grupos seleccionados; DAPI (Azul), BrdU (rojo), $n=100$. T de student, ns $P > 0.05$, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$. Promedio $\pm$ error estándar. Aumento 10X.

III.1.2 Insolubilidad proteica

En enfermedades por desorden del plegamiento de proteínas, es bien sabido que las proteínas agregadas adquieren una conformación que las transforma en formas insolubles en detergente [106]. Es por eso que se decidió realizar la extracción de proteínas insolubles en muestras de distintas edades de los modelos seleccionados y cuantificarlas con el objetivo de observar si con el envejecimiento existe una tendencia a la formación y acumulación de proteínas insolubles. Se observó que en todas las muestras analizadas, una parte del proteoma incrementa su insolubilidad al extraer las proteínas en presencia de detergentes. Sin embargo, la cantidad de proteínas insolubles extraídas es significativamente mayor en el caso de las muestras envejecidas en los modelos de *C. elegans*, FEMs, cerebro y corazón de ratón (**Figura 7**, paneles A, B, C y D). Adicionalmente, al comparar los niveles de insolubilidad entre muestras jóvenes, adultas y envejecidas, se observó que la acumulación de proteínas insolubles parece ser un fenómeno que ocurre de manera progresiva durante la vida. En el caso de las muestras de hígado e intestino no se observó un incremento en la insolubilidad (**Figura 7**, paneles E y F), lo cual puede explicarse por el hecho de que estos órganos sufren recambio celular, a diferencia del cerebro y corazón. Una posibilidad es que durante la división celular los agregados se diluyen entre las células hijas y activan los mecanismos para su degradación, por lo cual no fue posible detectar un incremento de los mismos durante el envejecimiento.

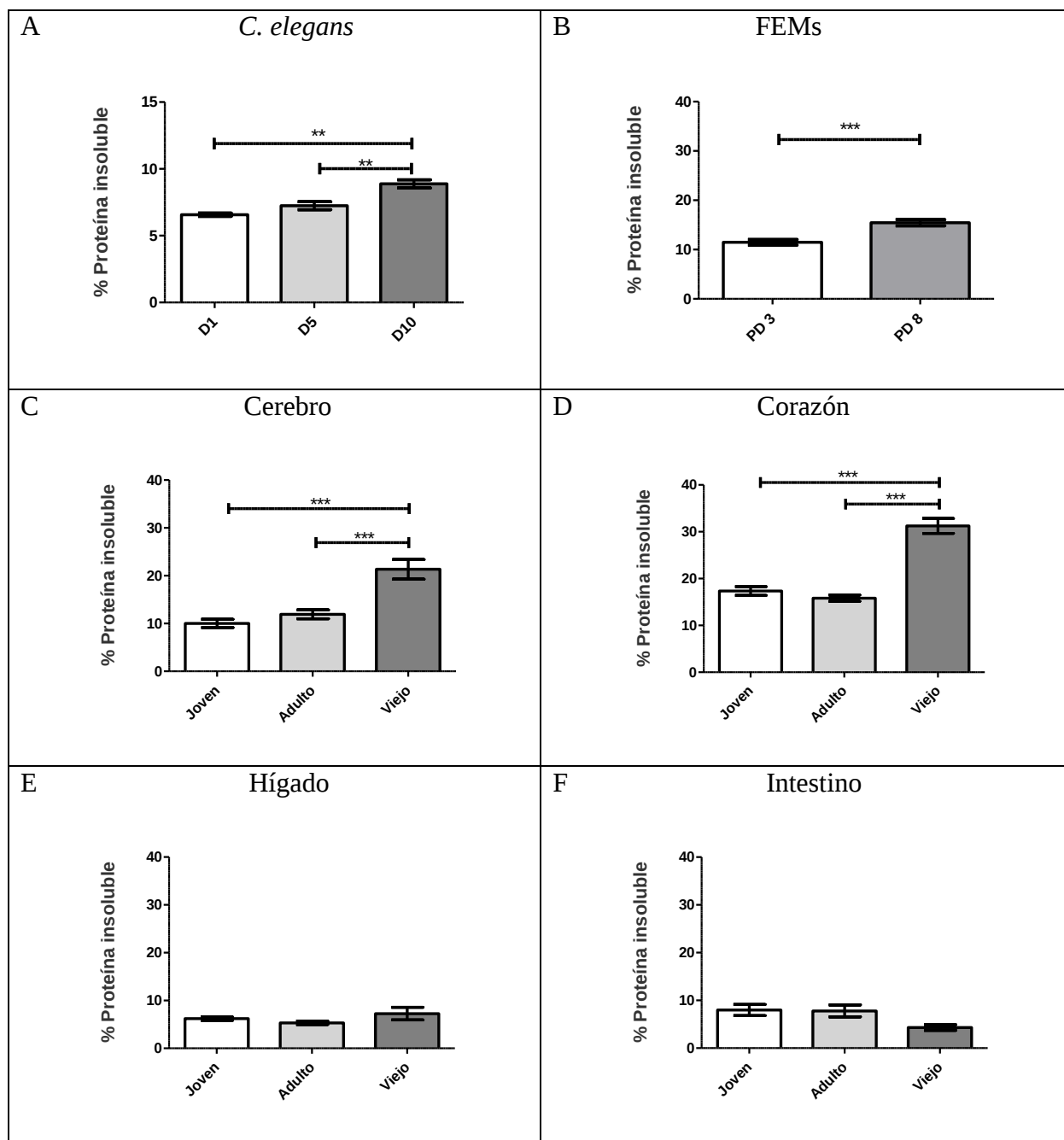


Figura 7. Porcentaje de proteína insoluble. Muestras de: A) *C. elegans*, día 1 (D1), día 5 (D5) y día 10 (D10), n=3; B) FEMs, jóvenes (PD 3) y senescentes (PD 8), n=3; C) Cerebro de ratón D) Corazón de ratón E) Hígado de ratón y F) Intestino de ratón, joven (3 meses), adulto (12 meses) y viejo (22-27 meses), n=8. ANOVA de una vía, prueba de Tukey. T de student (FEMs), ns P > 0.05, *P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01, ***P ≤ 0.001. Promedio ±error estándar.

Existe evidencia de que cientos de proteínas se vuelven insolubles durante el envejecimiento en *C. elegans* [19,20] y *S. cerevisiae* [21]. Para determinar si lo mismo sucede en la fracción insoluble de los órganos de ratón estudiados, se analizaron los homogeneizados totales (HT) y las fracciones insolubles a través de electroforesis SDS-PAGE y tinción de Coomassie (**Figura 8**). La intensidad de las bandas de muestras envejecidas de cerebro y corazón (**Figura 8**, paneles A y B, último carril de cada gel) indica que la fracción insoluble se encuentra enriquecida, lo cual es consistente con los resultados presentados en la **Figura 7**, paneles C y D. Adicionalmente, se observa que en el homogeneizado total de los órganos analizados el patrón de expresión proteica cambia con la edad (**Figura 8**, primeros tres carriles de cada gel) y que múltiples bandas aparecen en la fracción insoluble (**Figura 8**, último carril de cada gel), sugiriendo que son varias y distintas las proteínas que presentan tendencia a la insolubilidad durante el envejecimiento en los órganos de ratón analizados.

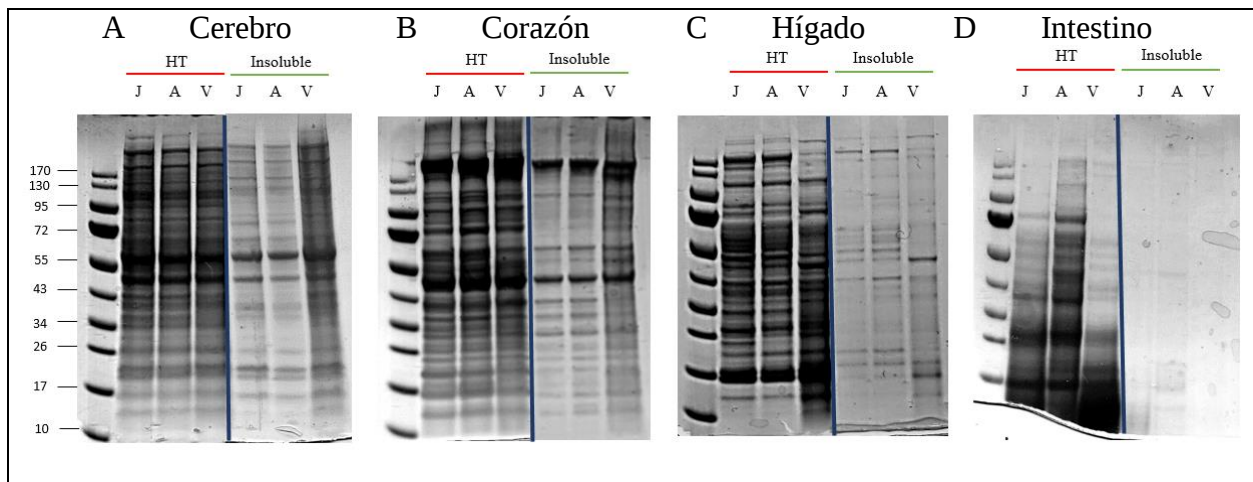


Figura 8. Electroforesis SDS-PAGE y tinción de Coomassie de los homogeneizados totales (HT) y fracciones insolubles. Muestras de: A) Cerebro, B) Corazón, C) Hígado y D) Intestino de ratones jóvenes (J), adultos (A) y viejos (V).

III.1.3 Ensayo de tioflavina T

La tioflavina es una molécula benzotiazólica que exhibe un incremento en su fluorescencia al unirse a fibras amiloides y es comúnmente utilizada para la detección de amiloides, *ex vivo* e *in vitro* [107]. Ha sido utilizada para analizar la formación de agregados de proteínas amiloidogénicas tales como α -sinucleína, β -amiloide, insulina, etc. La interacción de la tioflavina con dichos agregados potencia la fluorescencia debido a su inmovilización. Esta molécula se comporta como un rotor molecular; en solución una barrera de baja energía permite la rotación libre de los anillos de benzilamina y benzotiazol, dicha rotación mitiga rápidamente los estados excitados generados por la excitación de los fotones, causando una baja emisión de fluorescencia en la tioflavina libre. En contraste, la inmovilización rotacional de tioflavina conserva el estado excitado, generando un incremento en la fluorescencia. Existe evidencia de que las moléculas de tioflavina se asocian a agregados de proteínas estructurados como láminas β , al unirse a los canales que se forman entre las mismas debido a interacciones entre el grupo C=O de una hebra con el N-H de la otra. El grado de unión de la tioflavina depende de la accesibilidad que la misma tenga a dichas regiones de unión. Al inicio de los procesos de agregación existe muy poca o nula unión a la tioflavina. Una vez que las láminas β comienzan a formarse, la unión a tioflavina inicia e incrementa en proporción al contenido de láminas en el sistema [108]. El incremento en la fluorescencia puede observarse con un microscopio de fluorescencia o por un espectrofotómetro de fluorescencia [109].

Debido a las propiedades antes mencionadas, se decidió realizar el ensayo de la tioflavina para la caracterización de las fracciones de proteína insoluble aisladas durante el envejecimiento en los modelos seleccionados. De tal manera, con el objetivo de recabar evidencia referente al tipo y posible estructura secundaria de los agregados generados con la edad, se extrajeron las proteínas insolubles de las muestras tratadas con lipasa y DNasa y se monitoreó *in vitro* su unión a tioflavina

T. Adicionalmente, se analizaron muestras en ausencia de tioflavina, que fueron utilizadas para determinar los niveles intrínsecos de fluorescencia de las muestras y de esta manera substraerlos de las mediciones en presencia del fluoróforo. Los resultados se presentan en la **Figura 9**, donde se observa que en todas las muestras fue posible detectar fluorescencia, siendo más intensa en el caso de las muestras con mayor edad. Los valores de fluorescencia detectados en las muestras de *C. elegans* (**Figura 9**, panel A) registraron un incremento con la edad que no alcanzó los valores de significancia, sin embargo, presentaron una tendencia de aumento progresivo. La fluorescencia en el caso de las muestras de FEMs, corazón y cerebro de ratón (**Figura 9**, paneles B-D) se incrementó de manera progresiva y significativa con la edad, indicando la posible presencia de una fracción enriquecida de agregados con estructura secundaria de tipo lámina β . Dicho fenómeno no fue observado en las muestras de hígado e intestino (**Figura 9**, paneles E y F). Debido a que se ha reportado que la tioflavina puede unirse de manera inespecífica a otras moléculas tales como DNA, RNA, mucopolisacaridos, etc. [107], se realizó un pretratamiento de las fracciones insolubles con PK a concentraciones elevadas para destruir la proteína presente y de esta manera determinar si la señal observada previamente provenía de material de tipo proteico o no (**Figura 10**). Después de realizar la proteólisis se llevó a cabo la lectura de fluorescencia de las muestras en presencia de tioflavina y se observó que el tratamiento produjo un decremento de la señal de la misma, lo cual indica que los valores de fluorescencia obtenidos previamente se deben a la unión de la tioflavina a proteínas.

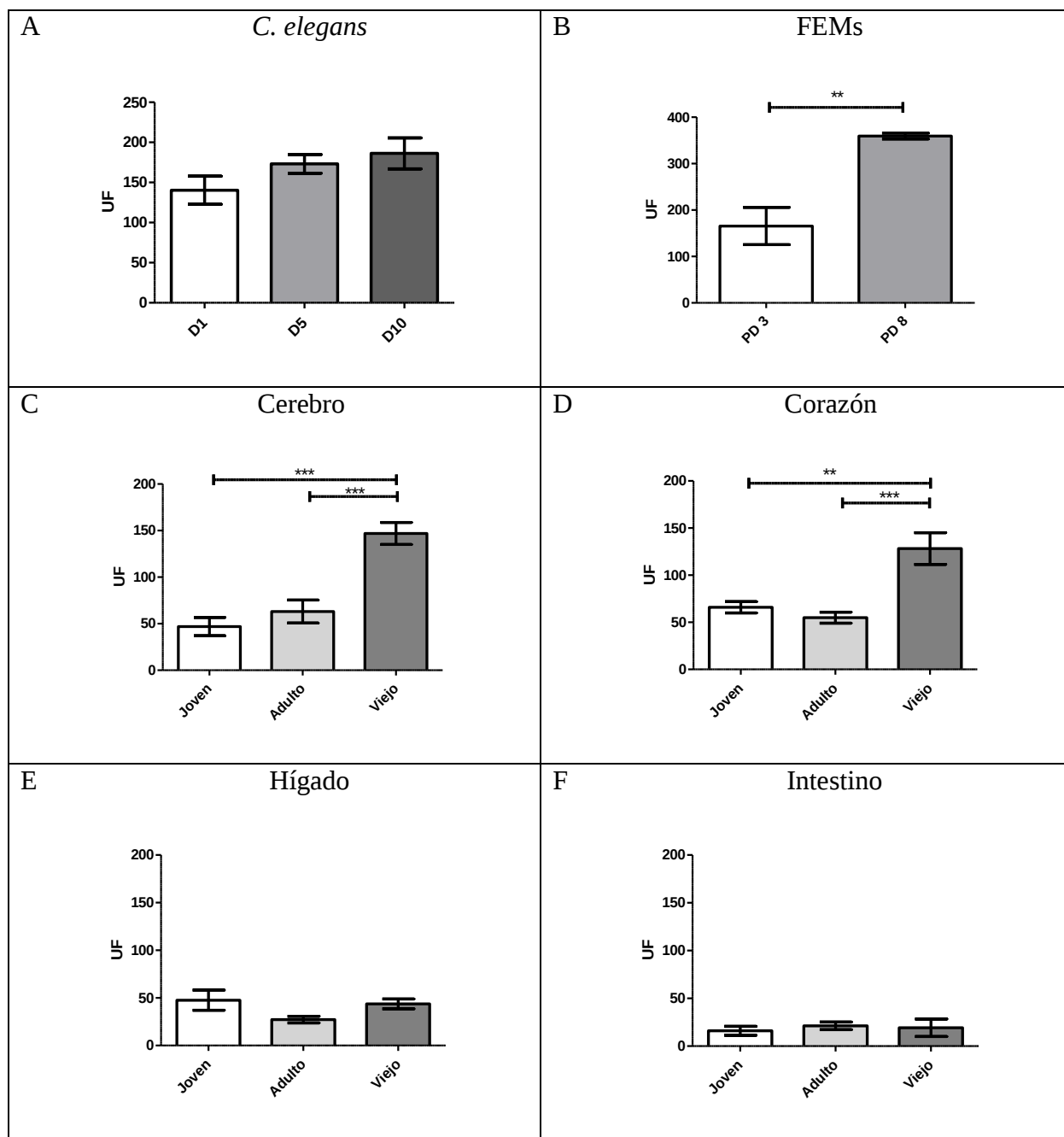


Figura 9. Señal de tioflavina T expresada en unidades de fluorescencia (UF) en la fracción insoluble. Muestras de: A) *C. elegans*, día 1 (D1), día 5 (D5) y día 10 (D10), n=3; B) FEMs, jóvenes (PD 3) y senescentes (PD 8), n=3; C) Cerebro de ratón D) Corazón de ratón E) Hígado de ratón e F) Intestino de ratón, joven (3 meses), adulto (12 meses) y viejo (22-27 meses), n=8. T de student (FEMs). ANOVA de una vía, prueba de Tukey. ns $P > 0.05$, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$. Promedio $\pm$ error estándar.

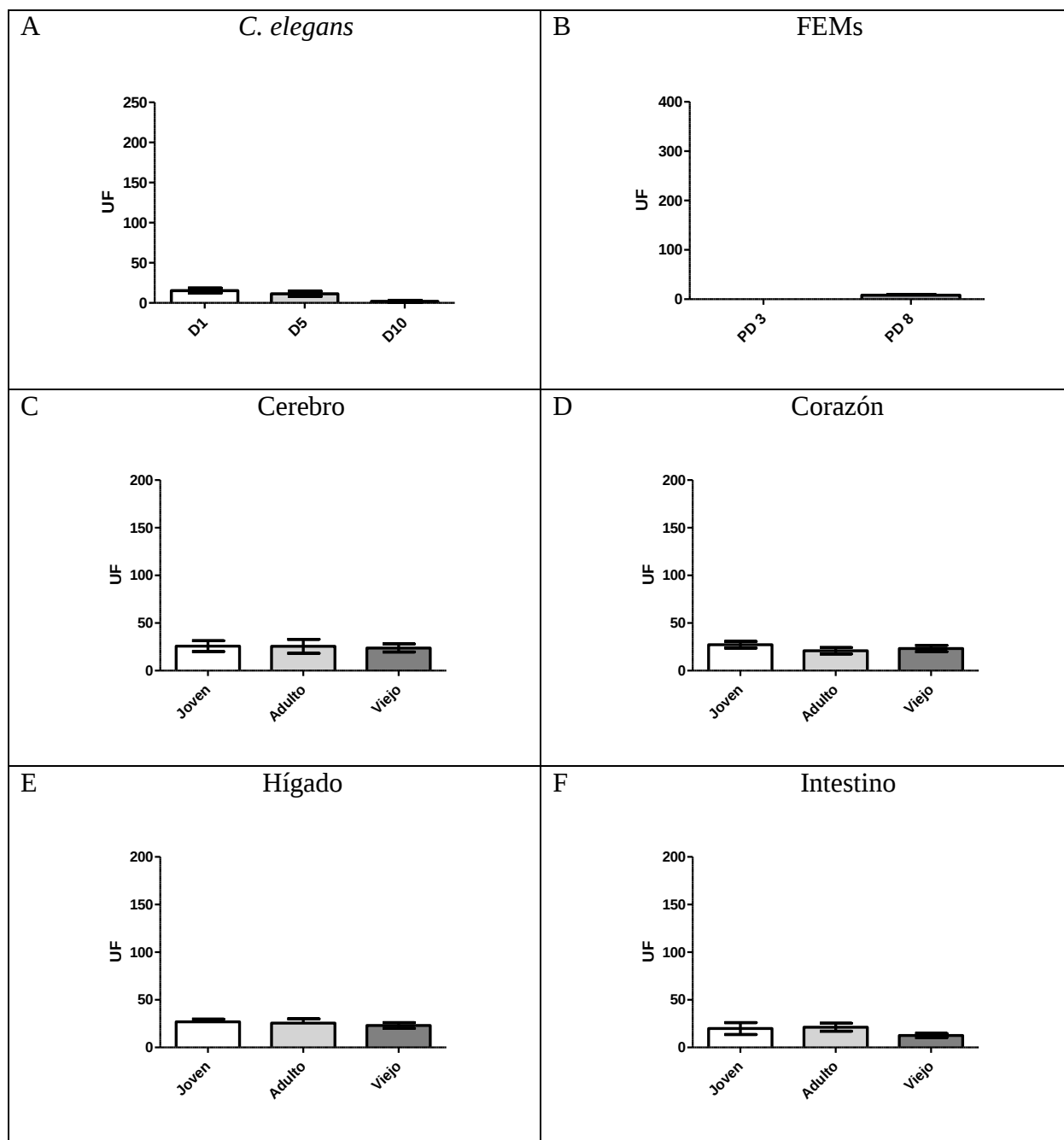


Figura 10. Señal de tioflavina T expresada en unidades de fluorescencia (UF) en la fracción insoluble pretratada con PK. Las muestras fueron tratadas con 1 mg/ml de PK por 1 hora a 37 °C. A) *C. elegans*, día 1 (D1), día 5 (D5) y día 10 (D10), n=3; B) FEMs, jóvenes (PD 3) y senescentes (PD 8), n=3; C) Cerebro de ratón D) Corazón de ratón E) Hígado de ratón e F) Intestino de ratón, joven (3 meses), adulto (12 meses) y viejo (22-27 meses), n=8. T de student (FEMs). ANOVA de una vía, prueba de Tukey. ns $P > 0.05$, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$. Promedio $\pm$ error estándar.

Está documentado el hecho de que con la edad existe acumulación en diversos tejidos de un pigmento conocido como lipofuscina [110]. Dicho compuesto tiene propiedades de autofluorescencia que traslapa con los espectros de excitación de algunos fluoróforos [111] y pudiera transferirles energía a través del fenómeno conocido como FRET (transferencia resonante de energía en fluorescencia) [112]. Para descartar la posibilidad de que la lipofuscina pudiera estar interfiriendo con la señal de la tioflavina T obtenida en las fracciones insolubles de los órganos de ratón analizados, se realizó la medición del espectro de emisión de fluorescencia de las muestras (200 nm a 900 nm) en presencia de tioflavina T a una excitación de 435 nm (**Figura 11**). Es posible observar que a ese valor de excitación sólo se presenta un pico máximo de emisión en el rango de longitud de onda esperado para la señal de tioflavina unida a amiloide (485-495 nm) [113]. La evidencia anterior descarta la posibilidad de interferencia con la señal de tioflavina.

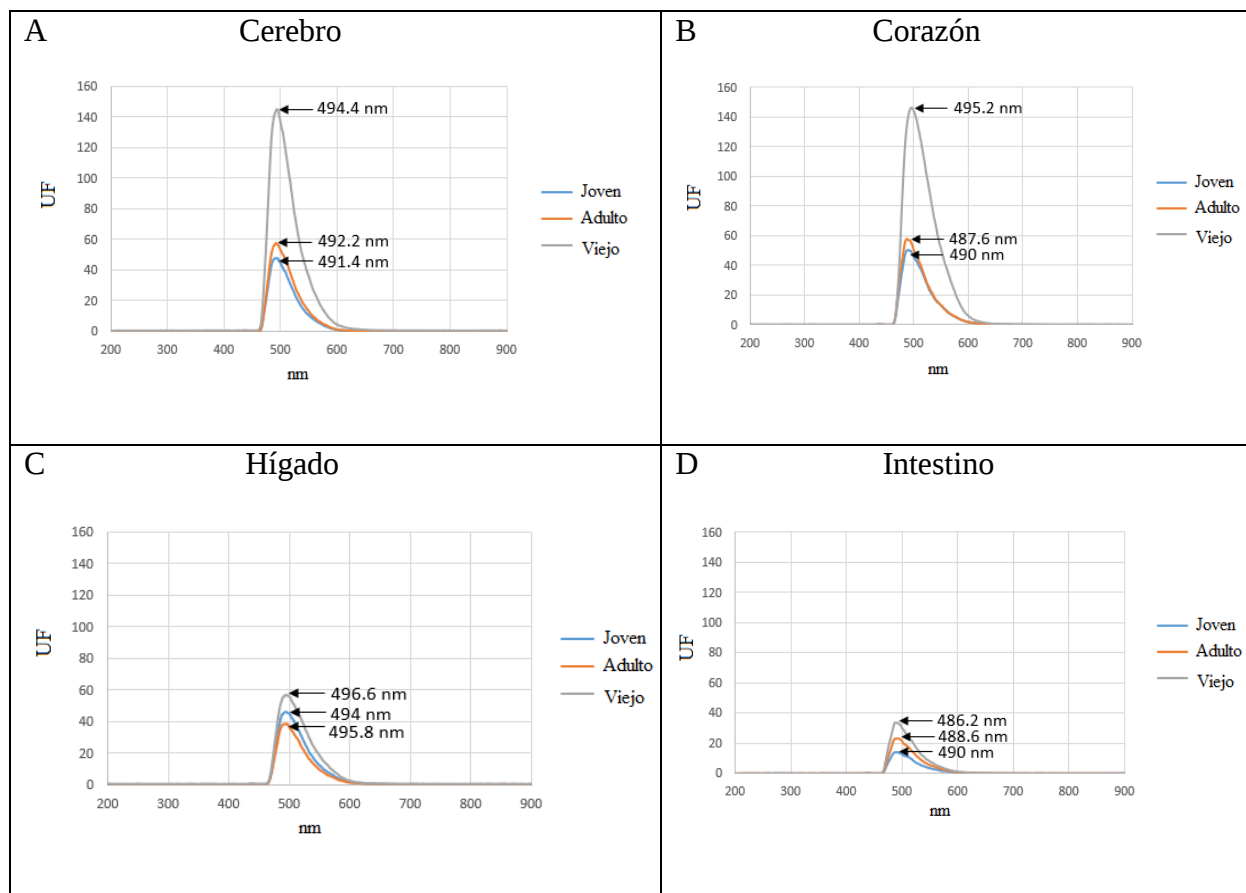


Figura 11. Espectro de emisión de fluorescencia (200 nm a 900 nm) de las fracciones insolubles. Muestras de: A) Cerebro, B) Corazón, C) Hígado y D) Intestino de ratón de distintas edades en presencia de tioflavina T 5 μ M a una excitación de 435 nm.

III.1.4 Resistencia a la digestión proteica

La resistencia extrema de los agregados amiloides a la degradación química, térmica y proteolítica es una propiedad adquirida comparada con las proteínas precursoras que los forman y es un prerequisite importante para su acumulación. Por ejemplo, la forma resistente a la digestión de la proteína priónica fue inicialmente detectada como el componente principal de los agregados infecciosos de alto peso molecular aislados por ultracentrifugación. Debido a dicha estabilidad, se

ha sugerido que las fibras amiloides representan un estado mínimo global de energía libre en términos de plegamiento proteico y agregación [114].

Para explorar si los agregados proteicos generados durante el envejecimiento son estables a la degradación proteica, se realizaron ensayos de digestión con PK en las muestras de los modelos estudiados. Los homogeneizados totales de *C. elegans* y FEMs fueron parcialmente digeridos con PK y posteriormente sometidos a electroforesis SDS-PAGE y tinción de Coomassie. En la **Figura 12**, paneles A y B se aprecia que el patrón de las bandas de las muestras de distintas edades es diferente, observándose una mayor resistencia en el caso de las muestras envejecidas, sugiriendo que la tendencia a la digestión disminuye con el tiempo. Con el objetivo de realizar un ensayo cuantitativo en la fracción insoluble de las muestras de cerebro, corazón, hígado e intestino de ratón, se utilizó el método de precipitación con metanol posterior a la digestión proteica. El porcentaje de proteína no digerida se presenta en la **Figura 12**, paneles C-F. Siguiendo una tendencia similar a los resultados de insolubilidad y tioflavina (**Figuras 7 y 9**, paneles C y D), se observó un aumento en la resistencia a la digestión de las proteínas contenidas en la fracción insoluble de corazón y cerebro (**Figura 12**, paneles C y D) de ratón del grupo de animales viejos. El porcentaje de proteína insoluble no digerida en las muestras de hígado e intestino (**Figura 12**, paneles E y F) no muestra diferencia significativa entre los grupos de edad, además de presentar valores menores a los observados en cerebro y corazón, lo cual indica que esos órganos poseen proteínas que tienen una menor resistencia a la digestión, sugiriendo que probablemente no forman agregados que propicien la resistencia proteolítica.

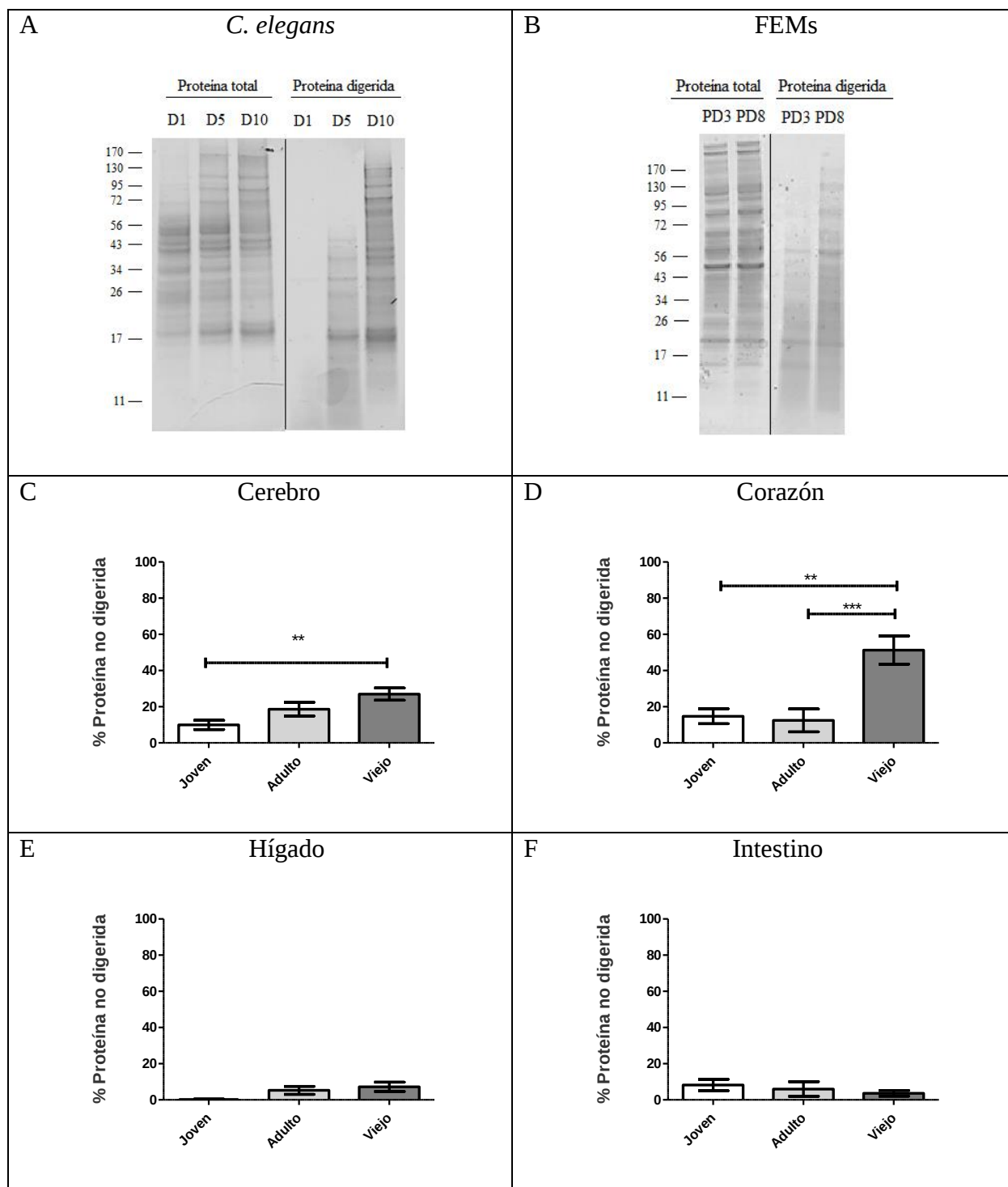


Figura 12. Proteína no digerida en muestras de homogeneizados totales. A) *C. elegans*, día 1 (D1), día 5 (D5) y día 10 (D10), n=3; B) FEMs, jóvenes (PD 3) y senescentes (PD 8) n=3 y fracciones insolubles de C) Cerebro de ratón D) Corazón de ratón E) Hígado de ratón e F) Intestino de ratón, joven (3 meses), adulto (12 meses) y viejo (22-27 meses), n=8. T de student (FEMs). ANOVA de una vía, prueba de Tukey. ns $P > 0.05$, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$. Promedio $\pm$ error estándar.

III.1.5 Inmunoquímica con anticuerpos conformacionales

Recientemente se han desarrollado anticuerpos conformacionales, los cuales parecen reconocer epítopos genéricos que son específicos a muchos tipos de fibras amiloides y no a sus monómeros solubles, independientemente de la secuencia de aminoácidos. Entre ellos se encuentra el anticuerpo conformacional A11, que reconoce un epítipo común a los oligómeros prefibrilares. Se cree que dichos oligómeros representan las especies primarias o patológicas y son conocidos como prefibrilares ya que preceden a la formación de fibras y desaparecen una vez que las mismas se han formado. Así mismo, el anticuerpo OC reconoce un epítipo genérico que se asocia con las fibras amiloides y los oligómeros fibrilares, también es dependiente de la conformación y es incapaz de reconocer las formas monoméricas [115,116].

Con el objetivo de determinar si los agregados generados durante el envejecimiento presentan reactividad a alguno de estos dos anticuerpos conformacionales, se realizaron tinciones inmunoquímicas en muestras de *C. elegans* y de FEMs (**Figura 13** y **Figura 14**). En las muestras de *C. elegans* la señal en los nemátodos envejecidos se encuentra principalmente localizada en el área gonadal (**Figura 13**, paneles A y B, días 5 y 10), lo cual hace difícil su distinción de la autofluorescencia característica del modelo (**Figura 13**, panel C); por lo tanto, a pesar de que en el caso de muestras envejecidas se observa un patrón punteado de reactividad (**Figura 13**, flechas en paneles A y B, días 5 y 10), no es posible obtener una conclusión a partir de estas tinciones. En el caso de las muestras del grupo de FEMs senescentes se observó un incremento en la reactividad para ambos anticuerpos (**Figura 14**, paneles derechos A y B), interesantemente se encuentra principalmente localizada en áreas adyacentes al núcleo, sugiriendo que los agregados proteicos podrían estar contenidos en agresomas, que son cuerpos de inclusión yuxtannucleares que se forman como respuesta celular general a la presencia de proteínas agregadas [117]. Para descartar que la

señal observada proviniera de una posible unión inespecífica del anticuerpo secundario, se realizaron tinciones en ausencia del anticuerpo primario y no se observó reactividad alguna (Figura 14, panel C).

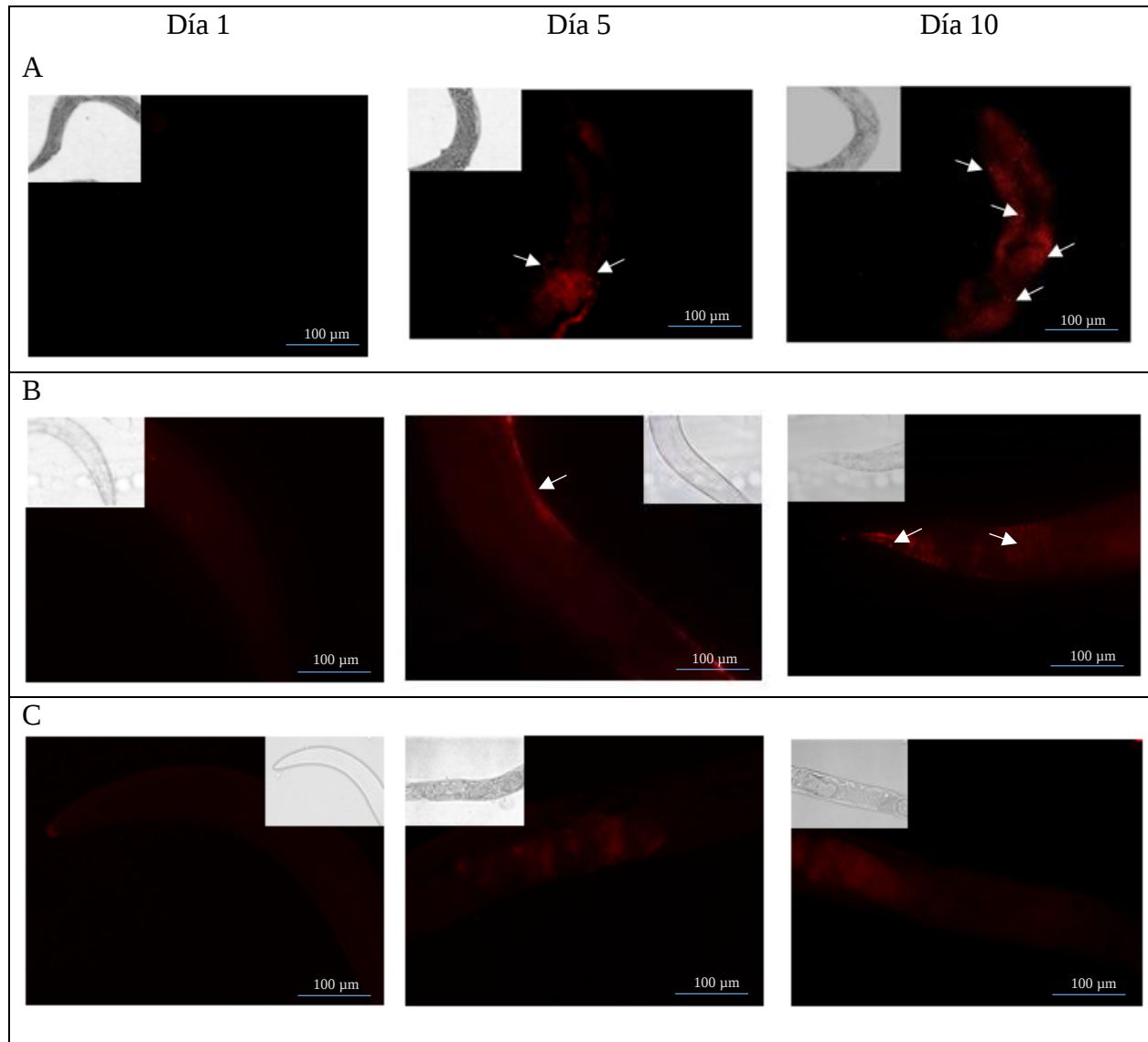


Figura 13. Fotomicrografías de *C. elegans* a los días 1, 5 y 10 teñidos con los anticuerpos A) A11 (rojo); B) OC (rojo) y C) señal de autofluorescencia en el canal rojo. En la esquina superior de cada imagen se muestran las imágenes en campo brillante. Magnificación 20x.

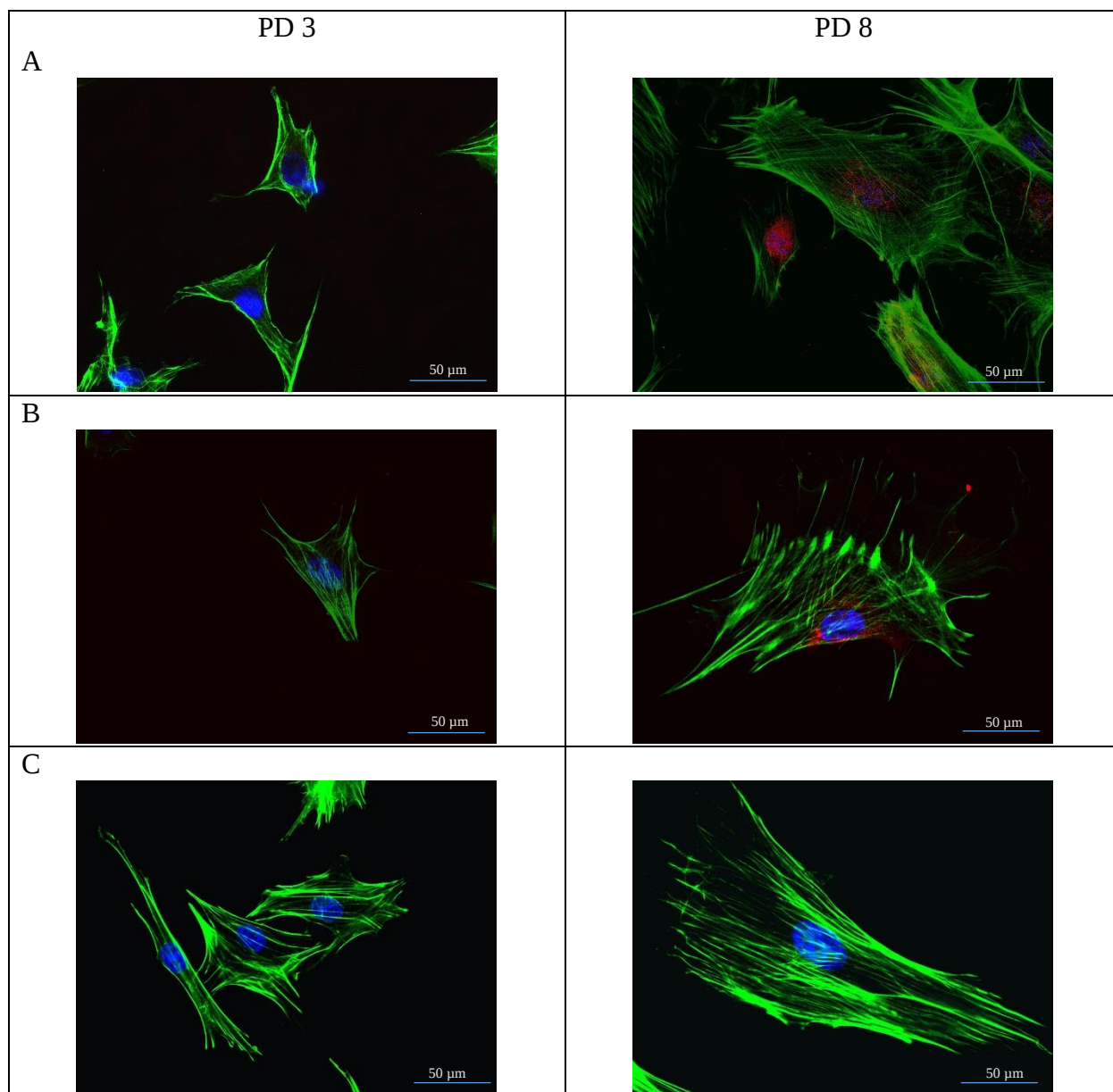


Figura 14. FEMs a los PD 3 y PD 8 teñidos con los anticuerpos A) A11; B) OC y C) únicamente anticuerpo secundario Alexa Flour 594. Azul (DAPI), Rojo (A11 u OC), Verde (faloidina). Magnificación 40x.

Adicionalmente se realizaron inmunoensayos de dot blot con los anticuerpos A11 y OC en las muestras de homogeneizados de *C. elegans* y FEMs y en las fracciones insolubles de cerebro, corazón, hígado e intestino de ratón (**Figura 15**). Se observó un incremento significativo a la reactividad para ambos anticuerpos en las muestras de *C. elegans* envejecidas (**Figura 15**, paneles A1 y A2); sin embargo no se registró diferencia en las muestras de FEMs (**Figura 15**, paneles B1 y B2). Para el caso de las fracciones insolubles de los órganos de ratón analizados se observó un incremento significativo en la reactividad al anticuerpo A11 en las muestras de cerebro, corazón e hígado (**Figura 15**, panel C1). Mientras que la reactividad al anticuerpo OC no presentó un incremento al comparar las muestras jóvenes con las envejecidas en dichos órganos (**Figura 15**, panel C2). Extrañamente, las muestras de intestino registraron una reactividad incrementada al compararlas con las de los otros órganos (**Figura 15**, paneles C1 y C2), lo cual no es consistente con los resultados bioquímicos obtenidos, lo anterior pudiera ser resultado de una unión inespecífica de los anticuerpos a algún componente presente en la fracción insoluble de intestino.

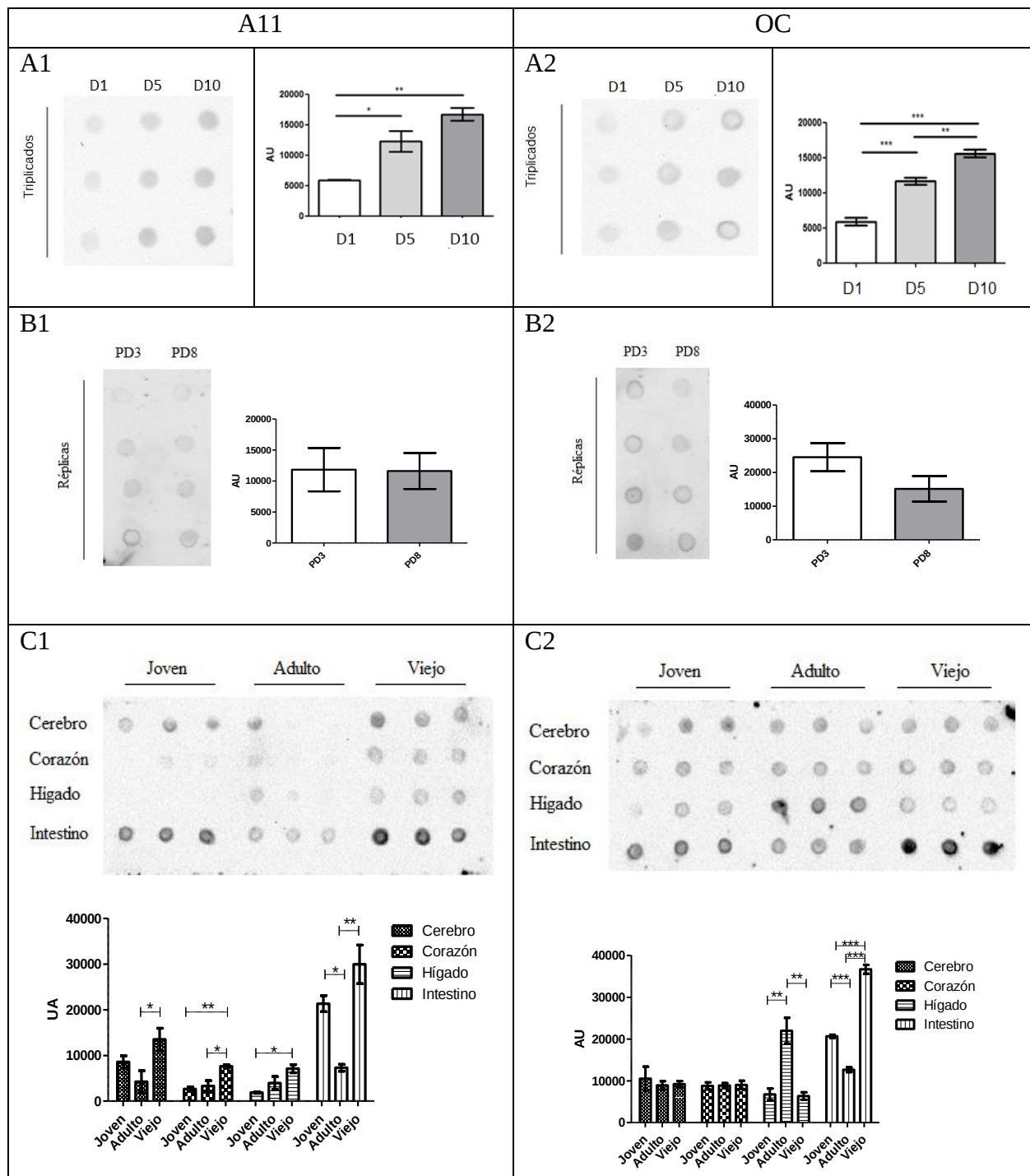


Figura 15. Dot blot con los anticuerpos conformacionales A11 (columna izquierda) y OC (columna derecha) de homogenizado total de A1 y A2) *C. elegans* a los días 1 (D1), 5 (D5) y 10 (D10) de vida adulta, n=3; B1 y B2) FEMs PD3 y 8, n=4; C1 y C2) fracciones insolubles de cerebro, corazón, hígado e intestino de ratones jóvenes, adultos y viejos, n=3. La cuantificación de la intensidad se realizó con el programa Image J. T de student (FEMs). ANOVA de una vía, prueba de comparación de Tukey. ns $P > 0.05$, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$. Promedio $\pm$ error estándar.

III.2 Inhibición farmacológica de la agregación proteica como estrategia para retrasar el envejecimiento en *Caenorhabditis elegans*

Para investigar el efecto de la inhibición de la agregación proteica en el envejecimiento cronológico y biológico de *C. elegans* (donde se ha descrito que más de 400 proteínas se vuelven insolubles [19]), se trataron a los nemátodos con un grupo de compuestos inhibidores de la agregación, que poseen diversidad estructural y propiedades de inhibir los agregados independientemente de la secuencia aminoacídica. Para seleccionar los compuestos utilizados se realizó una revisión bibliográfica para identificar inhibidores reportados *in vitro* y con un amplio espectro de actividad inhibitoria [34,35,38–40,45,118]. Se eligió a *C. elegans* como modelo porque su tamaño permite realizar estudios de múltiples compuestos en placas de 96 pozos, además de ser un modelo postmitótico lo cual facilita el estudio de la acumulación de moléculas dañadas durante el envejecimiento.

III.2.1 Identificación de compuestos inhibidores de la agregación que prolongan la sobrevivencia media en *Caenorhabditis elegans*

Se seleccionaron los compuestos miricetina, quinacrina, lacmoide, rodanina, negro de clorazol, ANSA y curcumina (**Figura 16**), dichos compuestos son estructuralmente diversos, lo cual es importante para minimizar la posibilidad de que el efecto observado sea dependiente de otras características comunes, como actividad antioxidante, por ejemplo.

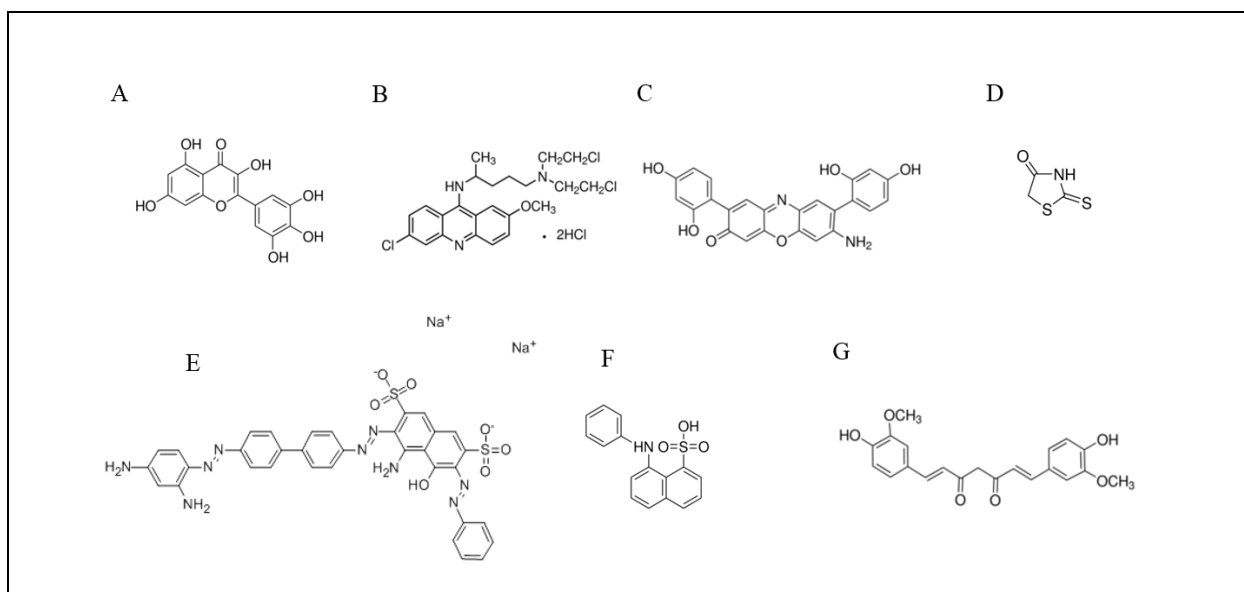


Figura 16. Estructura de los inhibidores de la agregación utilizados en este estudio. A) Miricetina, B) Quinacrina, C) Lacmoide, D) Rodanina, E) Negro clorazol, F) ANSA y G) Curcumina.

Los nemátodos fueron cultivados en medio líquido y tratados durante toda la vida adulta con los compuestos a las concentraciones finales de 7.5, 15, 30, 60, 120 y 240 μM ; para el caso de la curcumina se utilizaron las concentraciones de 20 y 100 μM . Se observó un incremento en la sobrevivencia media de los nemátodos tratados con todas las concentraciones de miricetina (27%, de 10 a 14 días), con quinacrina 7.5 μM (23%, de 13 a 16 días) y con ANSA 60 μM (15%, de 13 a 15 días). Sorpresivamente, el tratamiento con curcumina no ocasionó efecto en la sobrevivencia, lo cual puede ser explicado por el hecho de que fue el único compuesto en el que se observó la formación de precipitados al añadirlo al medio líquido. Adicionalmente, las concentraciones más bajas (7.5 μM) de negro clorazol y rodanina incrementaron la sobrevivencia media un 31% (de 13 a 17 días) y 8% (de 13 a 14 días) respectivamente; sin embargo, concentraciones más elevadas resultaron tóxicas y causaron una reducción en la sobrevivencia media. Un efecto tóxico similar se observó con el lacmoide, donde todas las concentraciones redujeron la sobrevivencia. En

resumen, el tratamiento con 5 de los 7 compuestos seleccionados incrementaron la sobrevivencia media en *C. elegans* (**Tabla 3**).

Tabla 3. Resultados del estudio en medio líquido. Todos los compuestos fueron probados a 7.5, 15, 30, 60, 120 y 240 μM , con excepción de la curcumina para la cual se utilizaron las concentraciones 20 and 100 μM . Las columnas 3 a 8 contienen el porcentaje de cambio en la sobrevivencia media calculado con respecto al control apropiado. Los valores negativos indican que el tratamiento causó una reducción en la sobrevivencia media.

Compuesto	Grupo	Efecto en la sobrevivencia media					
		7.5 μM	15 μM	30 μM	60 μM	120 μM	240 μM
Miricetina	Polifenol	33%	33%	33%	33%	33%	33%
Quinacrina	Fenotiazina	23%	8%	8%	8%	8%	8%
ANSA	Organosulfuro	0%	0%	0%	15%	0%	0%
Negro de clorazol	Compuesto sulfonado	30%	-8%	-8%	-8%	-8%	-8%
Rodanina	Tiazolidina	8%	0%	-8%	-8%	-15%	-23%
Lacmoide	Fenotiazina	-6%	-6%	-6%	-6%	-6%	-6%
Curcumina	Curcuminoide	0% a 20 μM			0% a 100 μM		

III.2.2 Estudio de la longevidad en medio sólido

Los nemátodos tratados con miricetina, quinacrina y ANSA tuvieron un incremento $\geq 15\%$ en la sobrevivencia. Dichos compuestos fueron seleccionados para su validación en los estudios de medio sólido, donde el efecto en el envejecimiento cronológico y biológico puede ser confirmado. Debido a los numerosos reportes que indican la actividad antiagregatoria de la curcumina [119][120][121], se decidió probarla en medio sólido.

Todos los tratamientos probados extendieron la longevidad en los nemátodos tratados en medio sólido, al compararlos con el control apropiado (**Figura 17**). La sobrevivencia promedio se incrementó con quinacrina 7.5 μM (18.3%, de 13.11 a 15.51 días) y la sobrevivencia máxima un

11.76% (de 17 a 19 días). La miricetina 120 μ M produjo un 34.33% de incremento en la sobrevivencia promedio (de 14.01 a 18.82 días) y un incremento de 33.33% en la sobrevivencia máxima (de 18 a 24 días). Interesantemente, la concentración de ANSA tuvo que incrementarse de 60 μ M (la cual fue efectiva en medio líquido) a 120 μ M para observar un efecto significativo. Probablemente ANSA es menos estable en medio sólido y es por eso que el efecto se observó a una concentración más alta que en el medio líquido. El tratamiento con ANSA 120 μ M produjo un 22.71% de prolongación en la sobrevivencia promedio (de 11.4 a 13.99 días) y 15.38% en la sobrevivencia máxima (de 13 a 15 días). Como se mencionó anteriormente, la curcumina precipitó en el ensayo de medio líquido, sin embargo no se observó precipitación alguna en el ensayo en medio sólido, lo cual permitió observar un efecto positivo en la longevidad. El tratamiento con curcumina 100 μ M incrementó la sobrevivencia promedio un 12.62% (de 15.44 a 17.39 días) y la sobrevivencia máxima un 27.77% (de 18 a 23 días). Se observó una fuerte precipitación del negro de clorazol en el medio sólido, evitando el análisis de su efecto.

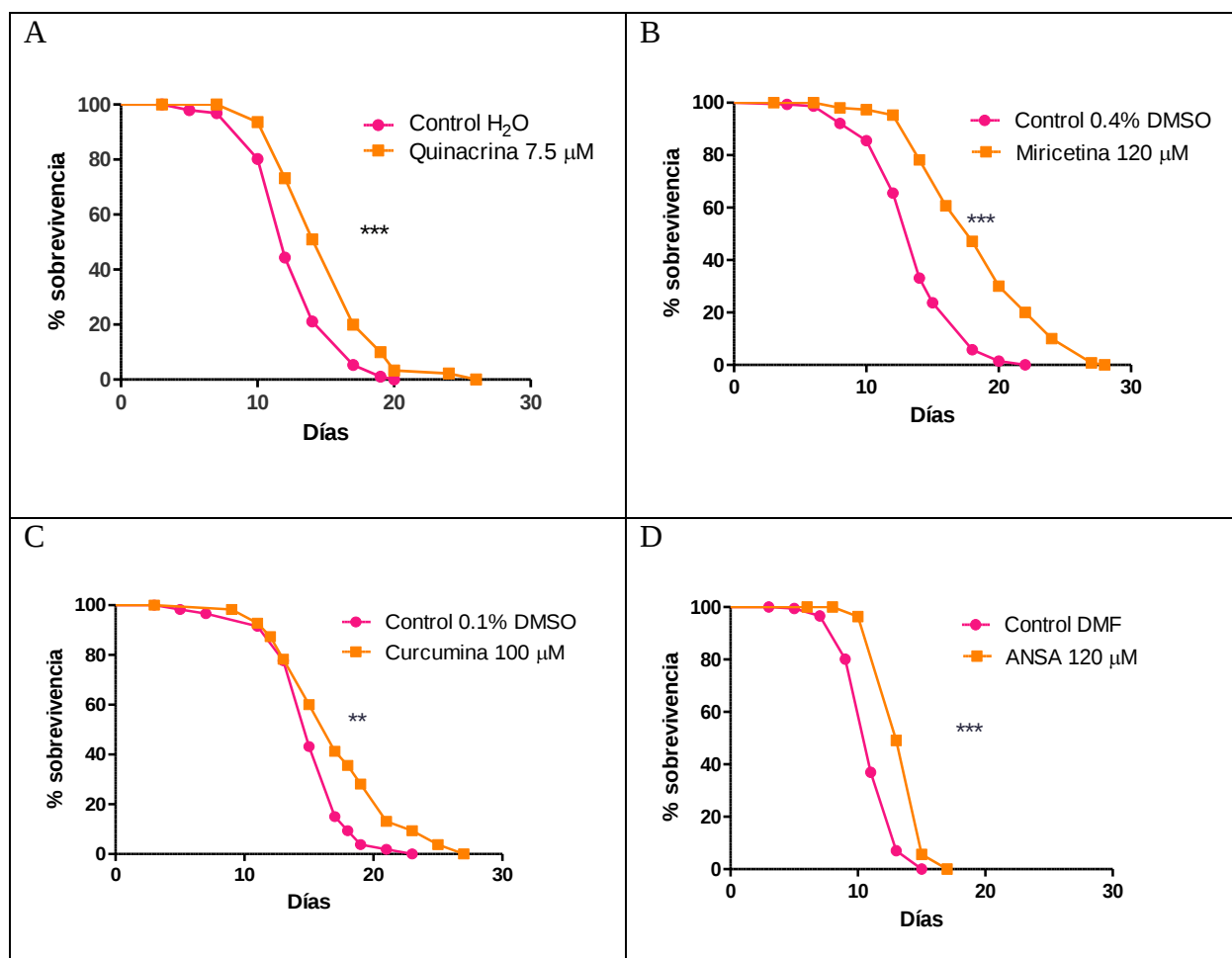


Figura 17. Curvas de sobrevivencia de los nemátodos tratados en medio sólido. A) Quinacrina 7.5 μM (n=99), B) Miricetina 120 μM (n=160), C) Curcumina 100 μM (n=60) y D) ANSA 120 μM (n=117). Los análisis estadísticos se realizaron con la prueba de log-rank al comparar con el control apropiado, $P > 0.05$, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

III.2.3 Estudio del envejecimiento biológico en medio sólido

Existen numerosos estudios donde se reportan biomarcadores para caracterizar el envejecimiento en *C. elegans* [122]. Dentro de ellos, la tasa de bombeo faríngeo es uno de los marcadores no invasivos y más aceptados para el estudio del envejecimiento biológico. En *C. elegans*, la faringe es un órgano neuromuscular que controla la introducción de alimento del exterior al interior del nemátodo, a través de una serie de contracciones conocidas como bombeo faríngeo. Se encuentra

bien documentado el hecho de que el bombeo faríngeo disminuye con el envejecimiento y está relacionado con la degeneración muscular en este modelo [122,123].

Para determinar si el tratamiento con los inhibidores de la agregación que prolongaron la longevidad en medio sólido, incrementa también el estado de salud del nemátodo, se utilizó un estudio en medio sólido para medir los cambios en la tasa de bombeo faríngeo a los días 2, 4, 6 y 8 de vida adulta (**Figura 18**). Se eligieron esos días debido a que se encuentra reportado que no es posible observar el bombeo faríngeo después del día 12 de vida adulta [124].

Los tratamientos con miricetina, quinacrina, ANSA y curcumina retrasaron la disminución del bombeo faríngeo, sugiriendo que la extensión observada en la longevidad (**Figura 17**) se encuentra acoplada a un incremento en el estado de salud de este modelo. A continuación se presenta un resumen de los resultados presentados en la **Figura 18**. Miricetina (día 2, 119.2 ± 2.673 vs control 99.97 ± 2.7 ; día 8, 72.70 ± 5.868 vs control 33.83 ± 4.789), quinacrina (día 2, 123.1 ± 1.533 vs control H_2O 95.63 ± 1.567 ; día 8, 58.47 ± 5.686 vs control 25.80 ± 2.735), ANSA (día 2, 122.2 ± 3.654 vs control 0.4% DMF 109.8 ± 2.119 ; día 8, 57.63 ± 5.541 vs control 31.83 ± 3.729) y curcumina (día 2, 123.8 ± 1.838 vs control 0.1% DMSO 100.4 ± 4.221 ; día 8, 93.60 ± 4.551 vs control 58.93 ± 7.032).

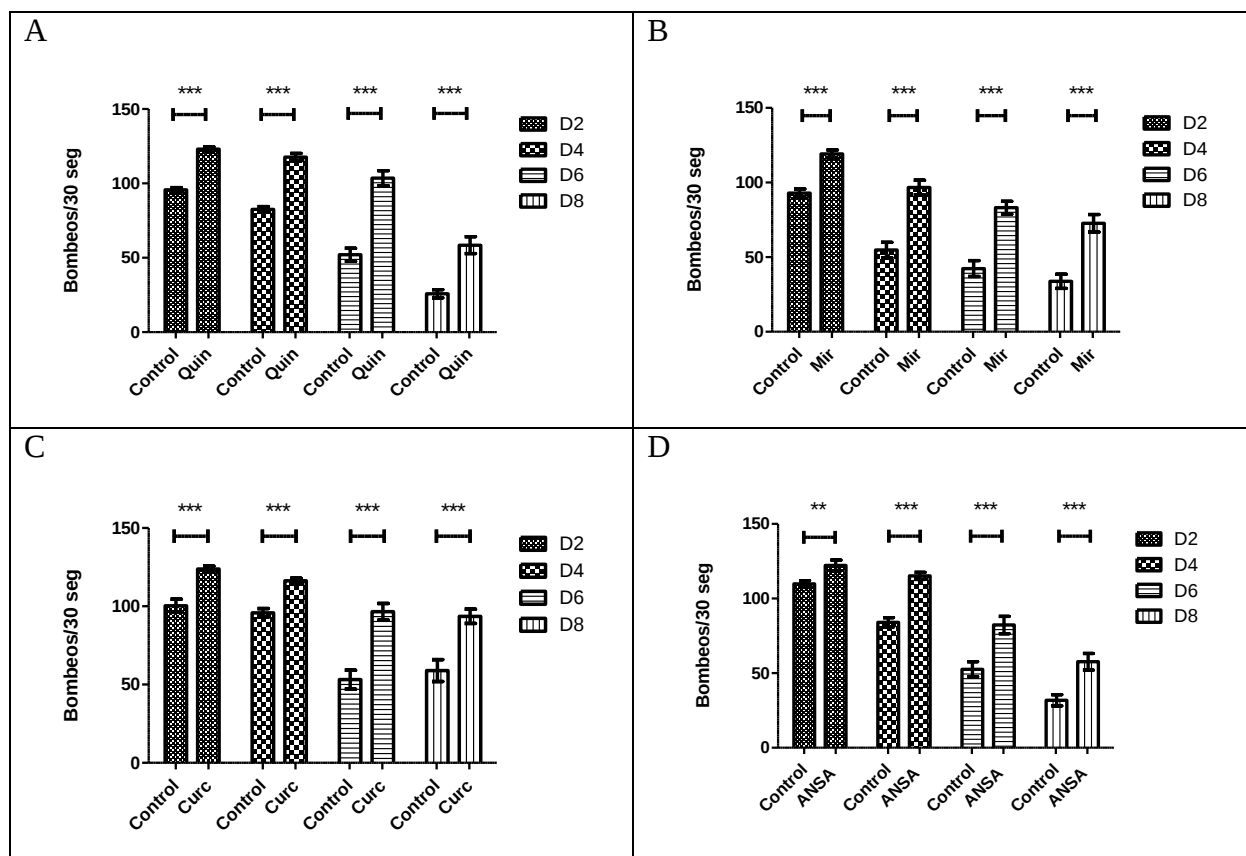


Figura 18. Efecto de los inhibidores de la agregación en la tasa de bombeo faríngeo de los nemátodos. A los días 2 (D2), 4 (D4), 6 (D6) y 8 (D8) de vida adulta tratados con A) Quinacrina 7.5 μ M, B) Miricetina 120 μ M, C) Curcumina 100 μ M y D) ANSA 120 μ M, n=30, T de student. ns $P > 0.05$, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

III.3 Manipulación de la proteostasis en *Caenorhabditis elegans* como estrategia para alterar el envejecimiento

Un nivel óptimo de actividad en la maquinaria de degradación parece ser crucial para mantener la proteostasis [50,125]. Con el objetivo de incrementar la maquinaria proteasomal de degradación de proteínas plegadas anormalmente y agregadas en *C. elegans* y observar su efecto en el envejecimiento, se decidió expresar el proteasoma de la arquea *Thermoplasma acidophilum*, compuesto por las subunidades α y β .

III.3.1 Generación de los plásmidos

Se obtuvo el plásmido pRSET5a que contiene los genes para las subunidades α y β del proteasoma de *Thermoplasma acidophilum* y un gen de resistencia a la ampicilina, dicho plásmido se amplificó en bacterias competentes y se seleccionaron las colonias por su resistencia a la ampicilina. El DNA plasmídico se purificó y por PCR se amplificaron ambas secuencias. Adicionalmente, se añadió una etiqueta de estreptavidina (subunidad α) y una etiqueta de hemaglutinina (subunidad β), con el objetivo de facilitar su posterior identificación. La información amplificada se digirió y se ligó al plásmido para *C. elegans* pCM1.57 (**Figura 19**, panel A), que posee un gen de resistencia a la kanamicina y un promotor inducible por choque térmico que permite controlar la expresión de la información al someter a los nemátodos a temperaturas elevadas. Posteriormente se transformaron bacterias *E. coli* DH5 α con los plásmidos y se seleccionaron las colonias resistentes a la kanamicina. La inserción correcta de la información se rectificó a través de digestión con las enzimas de restricción BamHI y KpnI. Los fragmentos observados corresponden al tamaño esperado (**Figura 19**, panel B).

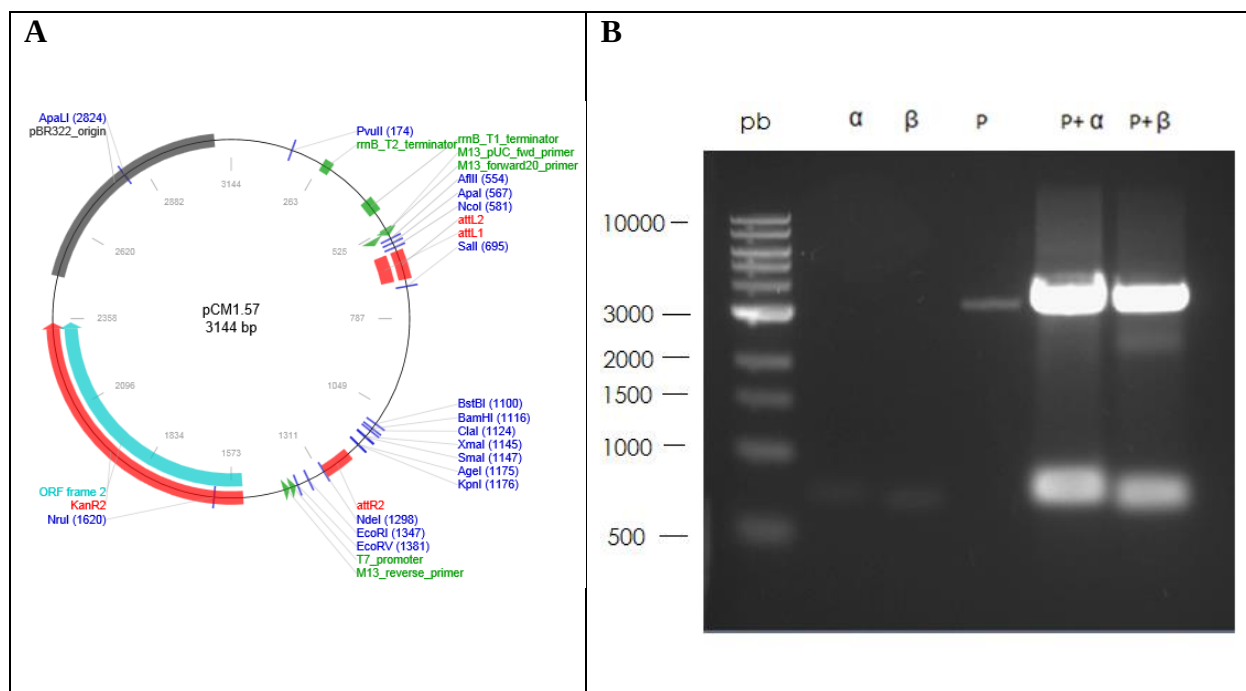


Figura 19. Clonación de las subunidades α y β del proteasoma de *Thermoplasma acidophilum* en el plásmido pCM1.57. A) Plásmido pCM1.57; B) Gel de agarosa 1% mostrando: pb, marcador de peso molecular; α y β , productos de PCR de las subunidades del proteasoma de *Thermoplasma acidophilum*, P plásmido pCM1.57 digerido (3144 pb), P + α (3144 pb + 726 pb) plásmido con la secuencia genética de la subunidad α digerido, P + β (3144 pb + 690 pb) plásmido con la secuencia genética de la subunidad β digerido.

Adicionalmente, el plásmido se secuenció y se confirmó por medio de un alineamiento usando el programa Clustal W, obteniendo un 100% de identidad (**Figuras 20 y 21**).

```

alfa_exp      ATGCAACAGGGCCAGATGGCTTACGATAGAGCGATTACGGTTTTTTCACCAGATGGTAGA 60
alfa_ncbi     ATGCAACAGGGCCAGATGGCTTACGATAGAGCGATTACGGTTTTTTCACCAGATGGTAGA 60
*****

alfa_exp      CTTTCCAGGTAGAGTATGCAAGGGAAGCAGTTAAGAAAGGTTCAACGGCGCTCGGTATG 120
alfa_ncbi     CTTTCCAGGTAGAGTATGCAAGGGAAGCAGTTAAGAAAGGTTCAACGGCGCTCGGTATG 120
*****

alfa_exp      AAATTCGCAAATGGTGTGCTCTTGATATCCGATAAGAAGGTAAGAAGCAGACTTATTGAG 180
alfa_ncbi     AAATTCGCAAATGGTGTGCTCTTGATATCCGATAAGAAGGTAAGAAGCAGACTTATTGAG 180
*****

alfa_exp      CAGAATTC AATTGAAAAGATACAGCTTATAGATGATTATGTTGCCGCAGTGACGTCCGGG 240
alfa_ncbi     CAGAATTC AATTGAAAAGATACAGCTTATAGATGATTATGTTGCCGCAGTGACGTCCGGG 240
*****

alfa_exp      CTGGTGGCAGACGCGAGAGTACTTGTGGACTTTGCCAGGATAAGCGCCAGCAGGAAAAG 300
alfa_ncbi     CTGGTGGCAGACGCGAGAGTACTTGTGGACTTTGCCAGGATAAGCGCCAGCAGGAAAAG 300
*****

alfa_exp      GTAACGTACGGATCGCTTGTAATATTGAGAATCTAGTTAAGAGAGTTGCTGACCAGATG 360
alfa_ncbi     GTAACGTACGGATCGCTTGTAATATTGAGAATCTAGTTAAGAGAGTTGCTGACCAGATG 360
*****

alfa_exp      CAGCAGTACACACAGTACGGTGGCGTAAGGCCATACGGTGTATCGCTGATCTTCGCTGGC 420
alfa_ncbi     CAGCAGTACACACAGTACGGTGGCGTAAGGCCATACGGTGTATCGCTGATCTTCGCTGGC 420
*****

alfa_exp      ATAGATCAGATCGGCCAAGGCTGTTGCGACTGCGATCCCGCCGGTACTATAAATGAGTAC 480
alfa_ncbi     ATAGATCAGATCGGCCAAGGCTGTTGCGACTGCGATCCCGCCGGTACTATAAATGAGTAC 480
*****

alfa_exp      AAGGCAACGGCCATCGGATCGGGCAAAGATGCCGTTGTGAGCTTCCTTGAGCGGAATAC 540
alfa_ncbi     AAGGCAACGGCCATCGGATCGGGCAAAGATGCCGTTGTGAGCTTCCTTGAGCGGAATAC 540
*****

alfa_exp      AAGGAAAACCTGCCGAGAAGGAAGCAGTGACGCTTGGAATAAAGGCGCTGAAATCTTCC 600
alfa_ncbi     AAGGAAAACCTGCCGAGAAGGAAGCAGTGACGCTTGGAATAAAGGCGCTGAAATCTTCC 600
*****

alfa_exp      CTTGAGGAGGGCGAAGAGCTTAAGGCTCCGGAGATCGCATCAATAACGGTGGGAAATAAG 660
alfa_ncbi     CTTGAGGAGGGCGAAGAGCTTAAGGCTCCGGAGATCGCATCAATAACGGTGGGAAATAAG 660
*****

alfa_exp      TACAGGATATACGATCAGGAGGAAGTTAAAAAATTC
alfa_ncbi     TACAGGATATACGATCAGGAGGAAGTTAAAAAATTC
*****

```

Figura 20. Alineamiento de la secuencia clonada de la subunidad α del proteasoma arqueano (alfa-exp) con la secuencia reportada (alfa-ncbi, GenBank X59507.1).

```

beta_exp      ATGAATCAGACTTTAGAAACTGGTACAACCACGGTTGGTATTACACTGAAAGACGCCGTA 60
beta_ncbi     ATGAATCAGACTTTAGAAACTGGTACAACCACGGTTGGTATTACACTGAAAGACGCCGTA 60
*****

beta_exp      ATAATGGCAACTGAAAGGCGTGTACAATGGAGAATTTTCATCATGCACAAGAATGGTAAA 120
beta_ncbi     ATAATGGCAACTGAAAGGCGTGTACAATGGAGAATTTTCATCATGCACAAGAATGGTAAA 120
*****

beta_exp      AAGCTGTTCCAGATCGACACTTATACGGGGATGACAATAGCCGGCCTTGTGGGAGATGCC 180
beta_ncbi     AAGCTGTTCCAGATCGACACTTATACGGGGATGACAATAGCCGGCCTTGTGGGAGATGCC 180
*****

beta_exp      CAAGTACTGGTAAGGTATATGAAGGCAGAGCTTGAACCTTTACAGGCTCCAGAGAAGAGTA 240
beta_ncbi     CAAGTACTGGTAAGGTATATGAAGGCAGAGCTTGAACCTTTACAGGCTCCAGAGAAGAGTA 240
*****

beta_exp      AACATGCCAATAGAGGCTGTTGCCACTCTGCTTTCAAACATGCTCAACCAGGTAAAATAC 300
beta_ncbi     AACATGCCAATAGAGGCTGTTGCCACTCTGCTTTCAAACATGCTCAACCAGGTAAAATAC 300
*****

beta_exp      ATGCCTTACATGGTCCAGCTGCTTGTGGGTGGAATTGATACAGCTCCCCACGTATTTTCC 360
beta_ncbi     ATGCCTTACATGGTCCAGCTGCTTGTGGGTGGAATTGATACAGCTCCCCACGTATTTTCC 360
*****

beta_exp      ATAGATGCGGCTGGAGGTTCCGTTGAGGATATCTATGCCAGCACAGGATCAGGCTCACCA 420
beta_ncbi     ATAGATGCGGCTGGAGGTTCCGTTGAGGATATCTATGCCAGCACAGGATCAGGCTCACCA 420
*****

beta_exp      TTCGTATACGGCGTTCTCGAATCGCAGTATAGCGAAAAGATGACCGTCGATGAAGGTGTC 480
beta_ncbi     TTCGTATACGGCGTTCTCGAATCGCAGTATAGCGAAAAGATGACCGTCGATGAAGGTGTC 480
*****

beta_exp      GATCTTGTGATAAGGGCCATAAGCGCGGCAAAGCAGAGGGATTGAGCATCTGGAGGTATG 540
beta_ncbi     GATCTTGTGATAAGGGCCATAAGCGCGGCAAAGCAGAGGGATTGAGCATCTGGAGGTATG 540
*****

beta_exp      ATAGATGTTGCGGTTATTACTAGGAAAGACGGATATGTCCAGCTTCCTACCGATCAGATA 600
beta_nc bi    ATAGATGTTGCGGTTATTACTAGGAAAGACGGATATGTCCAGCTTCCTACCGATCAGATA 600
*****

beta_exp      GAATCAAGGATCAGGAAGCTCGGATTAATTCTG
beta_ncbi     GAATCAAGGATCAGGAAGCTCGGATTAATTCTG
*****

```

Figura 21. Alineamiento de la secuencia clonada de la subunidad β del proteasoma arqueano (beta-exp) con la secuencia reportada (beta-ncbi, GenBank M83674.1).

III.3.2 Microinyección e integración

El siguiente paso consistió en microinyectar en la gónada de *C. elegans* los plásmidos de expresión para las subunidades del proteasoma de *Thermoplasma acidophilum*, junto con un plásmido marcador para expresar la proteína verde fluorescente como marcador. Como se indicó en la metodología, la progenie con el marcador se analizó por PCR de un solo nemátodo y western blot para comprobar la presencia y expresión de las subunidades proteasomales (**Figura 22**).

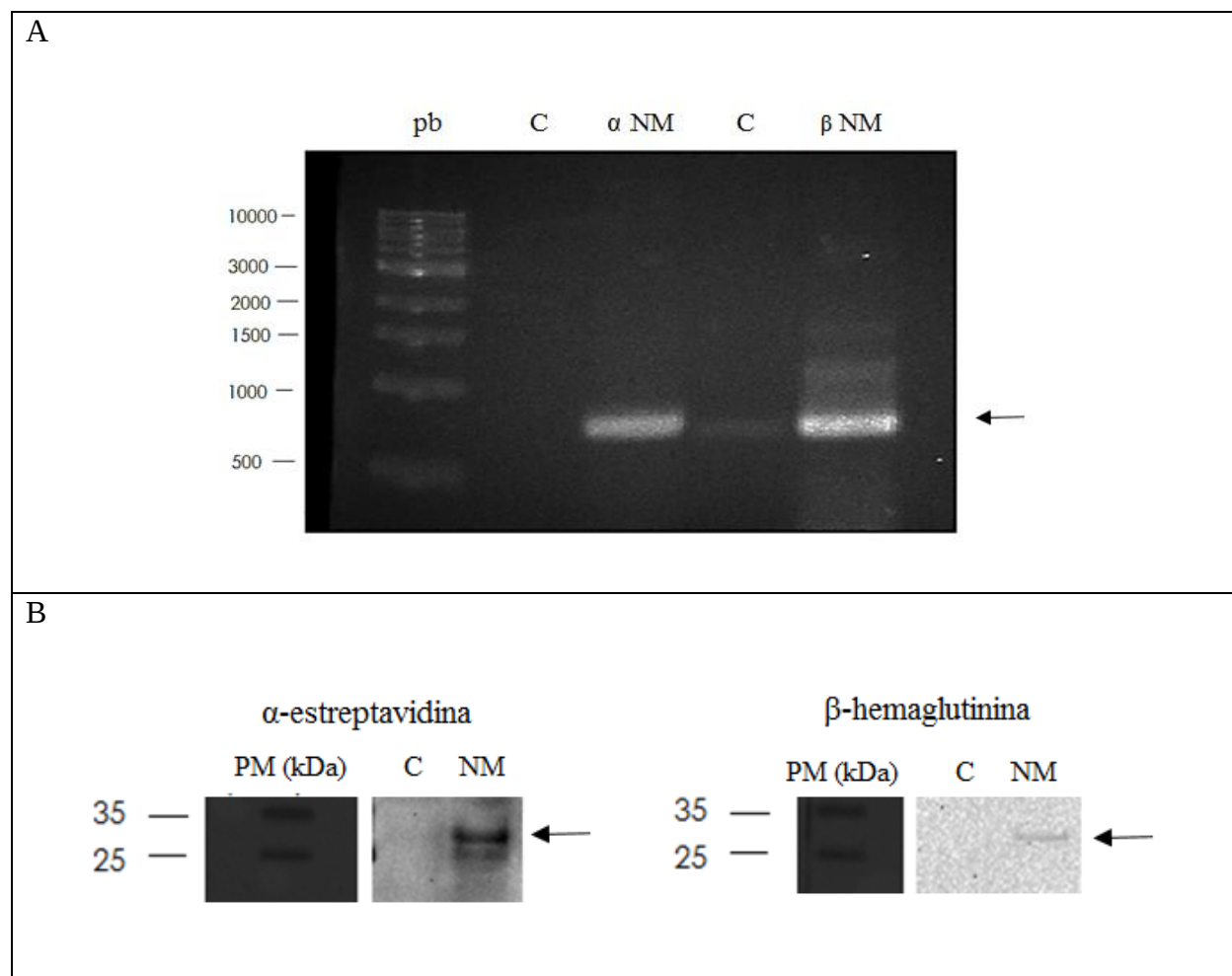


Figura 22. A) Análisis de los productos de la PCR de un solo nemátodo para la confirmación de la presencia de la información genética para las subunidades α (726 pb) y β (690 pb) en nemátodos microinyectados (NM); B) Western blot para verificar la expresión de las subunidades α y β tras someter a los NM a un choque térmico (33 °C / 1 hora). Subunidad alfa: 233 aa + etiqueta = aprox. 27 kDa. Subunidad beta: 211 aa + etiqueta = aprox. 25 kDa. C= control.

Posteriormente, se realizó la integración al DNA cromosomal. Se seleccionaron los nemátodos que integraron exitosamente la información (100% progenie fluorescente). Al final del proceso de integración se obtuvieron dos líneas integradas (denominadas 55 y 56). Dichas líneas fueron apareadas con nemátodos cepa salvaje por 5 generaciones subsecuentes para eliminar posibles mutaciones indeseables generadas durante el procedimiento (**Figura 23**).

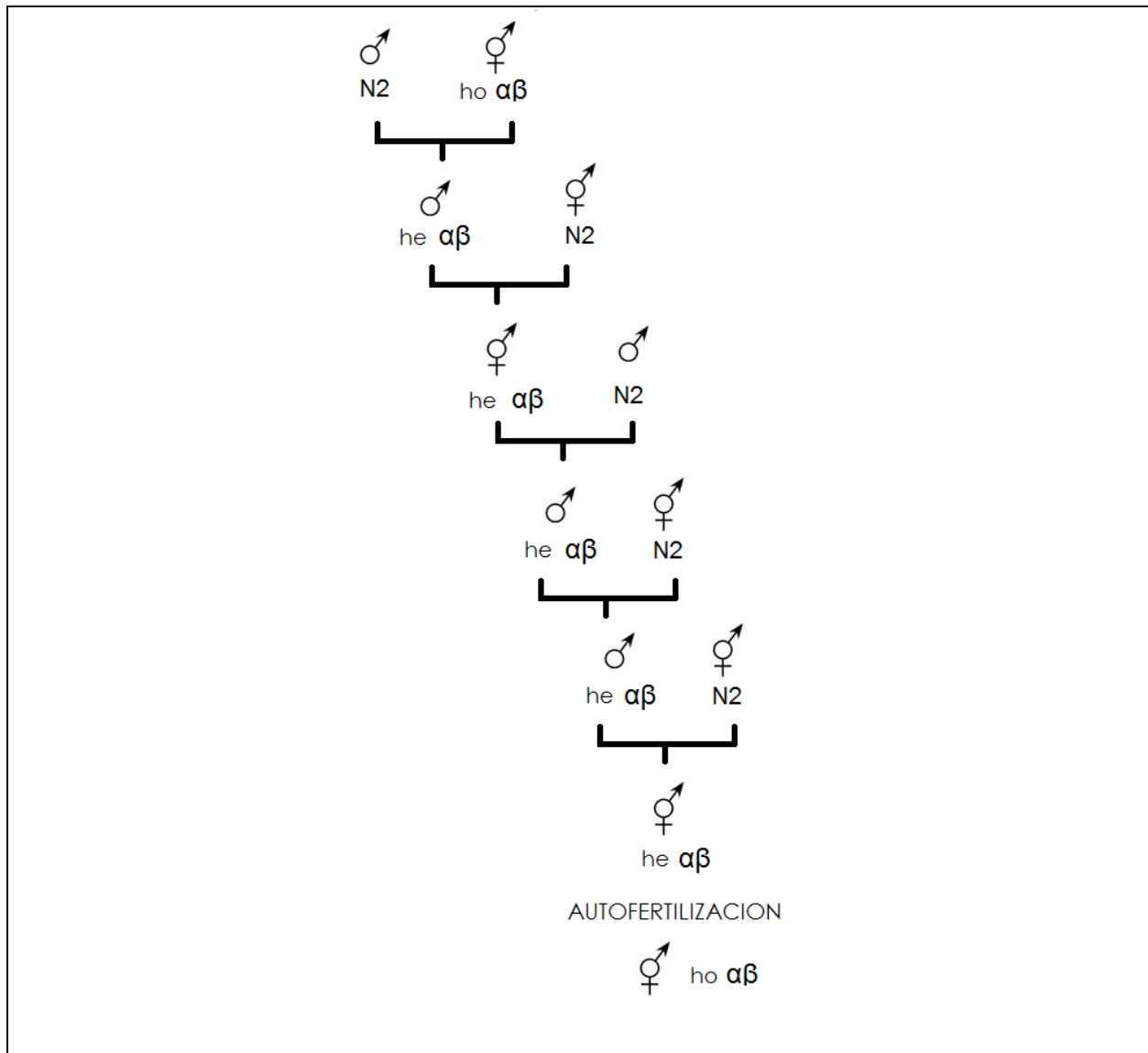


Figura 23. Representación esquemática del proceso de apareamiento entre las líneas integradas generadas ($\alpha\beta$) y nemátodos N2 cepa salvaje. Ho = homocigoto, he = heterocigoto. ♀ hermafrodita, ♂ macho.

Posteriormente se determinó la presencia de la información genética para las subunidades α y β del proteasoma arqueano por PCR con un solo nemátodo (**Figura 24**, panel A) y se llevó a cabo la inducción de la expresión al someter a un choque térmico a los nemátodos (etapa L3-L4, 33°C/1 hora). La presencia de las proteínas se confirmó por western blot (**Figura 24**, panel B).

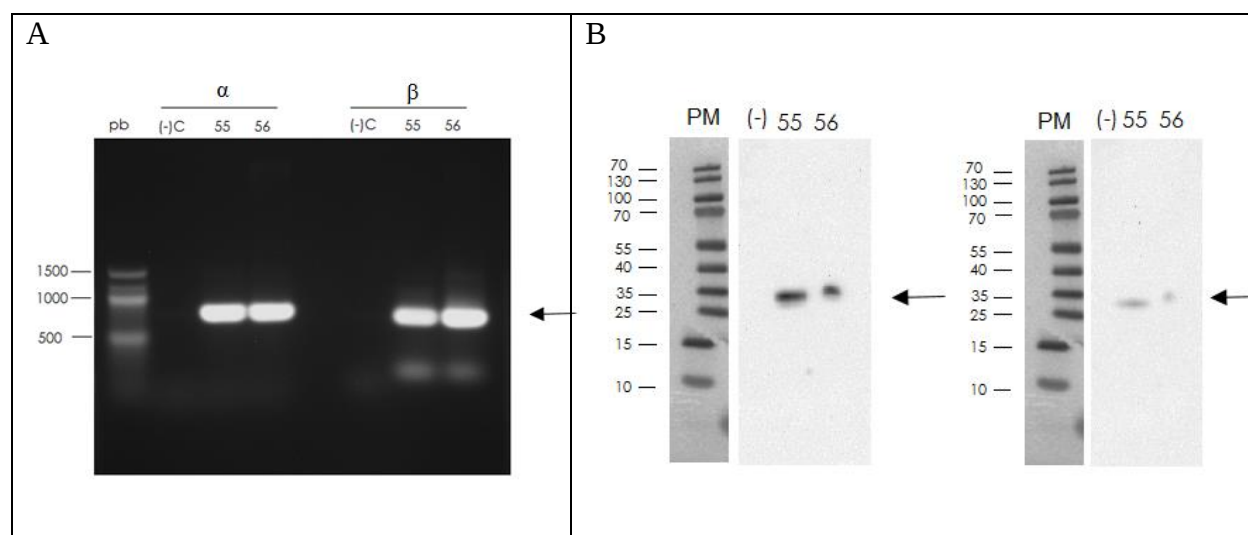


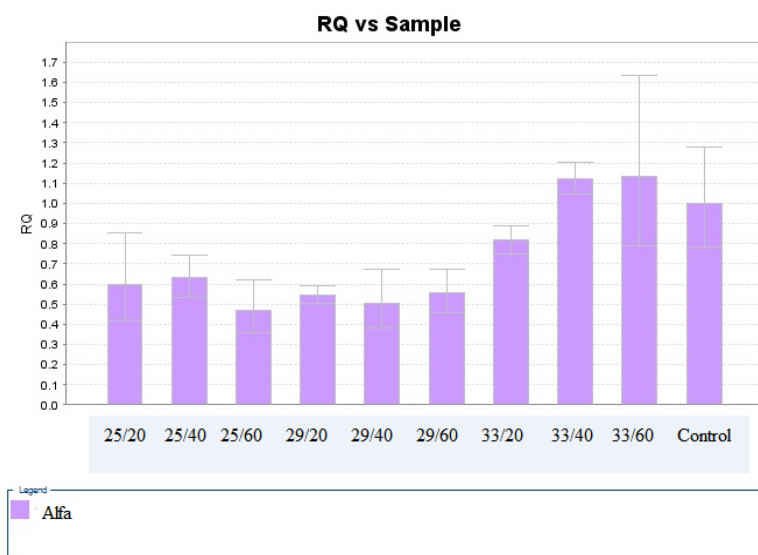
Figura 24. Confirmación de la presencia de la información genética y de la expresión de las subunidades α y β beta del proteasoma arqueano en las líneas transgénicas integradas generadas (55 y 56). (-) C: control negativo de *C. elegans* N2 (cepa salvaje) A) PCR de un solo nemátodo (α : 726 pb, β : 690 pb); B) Western blot realizado 24 horas después de exponer a los gusanos a un choque térmico de 33°C por una hora (α : 27 kDa, β : 25 kDa).

III.3.3 Medición de los niveles de expresión y de actividad proteasomal

Para los estudios de medición de los niveles de expresión y de la actividad proteasomal se eligió la cepa transgénica de *C. elegans* 55, que expresa el proteasoma arqueano (**Figura 24**). Para elegir el esquema más adecuado de inducción, se determinaron los niveles de expresión del mensajero de ambas subunidades mediante RT-PCR (**Figura 25**). Los tiempos y temperaturas seleccionados fueron los siguientes: 25 °C, 29 °C y 33 °C por 20, 40 y 60 minutos. A manera de control se utilizaron nemátodos cepa 55 no expuestos a choque térmico. De la **Figura 25** es posible concluir que el nivel máximo de expresión del mensajero de ambas subunidades se alcanza al someter las

muestras a una temperatura de 33 °C por 40 o 60 minutos, sin embargo, los niveles alcanzados son similares al control sin choque térmico.

A



B

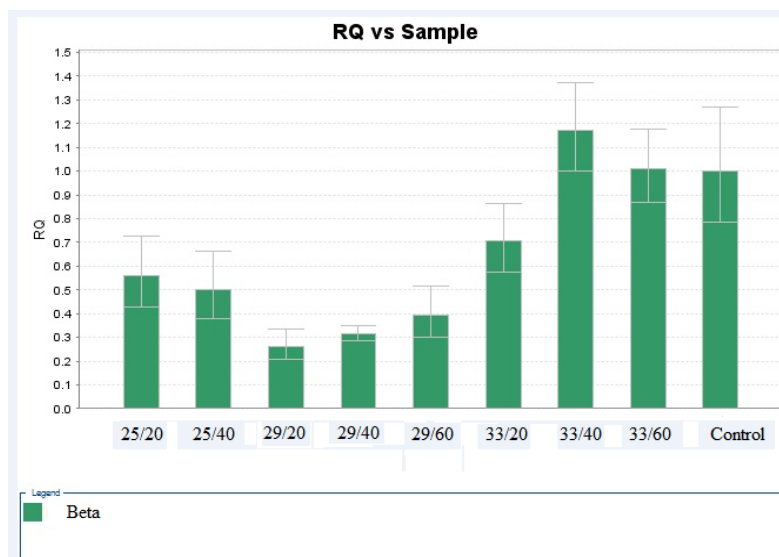


Figura 25. RT-PCR de las subunidades A) α y B) β del proteasoma arqueano en muestras de *C. elegans* cepa 55 expuestas a distintas temperaturas y tiempos de inducción (25 °C, 29 °C y 33 °C por 20, 40 y 60 minutos).

Los niveles más altos de expresión se obtuvieron con una inducción de 33 °C por una hora. De tal manera que los nemátodos fueron sometidos a un choque térmico bajo esas condiciones, con el objetivo de inducir la expresión de las subunidades α y β al día 1 de vida adulta. Después de 24 horas, las muestras fueron procesadas y analizadas para determinar la actividad tipo quimiotripsina usando un sustrato fluorescente. La cinética obtenida se presenta en la **Figura 26**, en general el choque térmico debería producir un incremento en la actividad proteasomal, sin embargo contrario a las expectativas se observa que después de la inducción, la cepa 55 presenta un nivel de actividad menor al de la cepa N2 que no contiene el proteasoma exógeno. Adicionalmente, la expresión del proteasoma arqueano ocasiona también un efecto tóxico en los nemátodos, pues se observó un incremento en la mortalidad de los mismos a etapas tempranas de la vida, así como alteraciones morfológicas. Lamentablemente, debido a lo antes mencionado, no se logró el cumplimiento de este objetivo de manera satisfactoria.

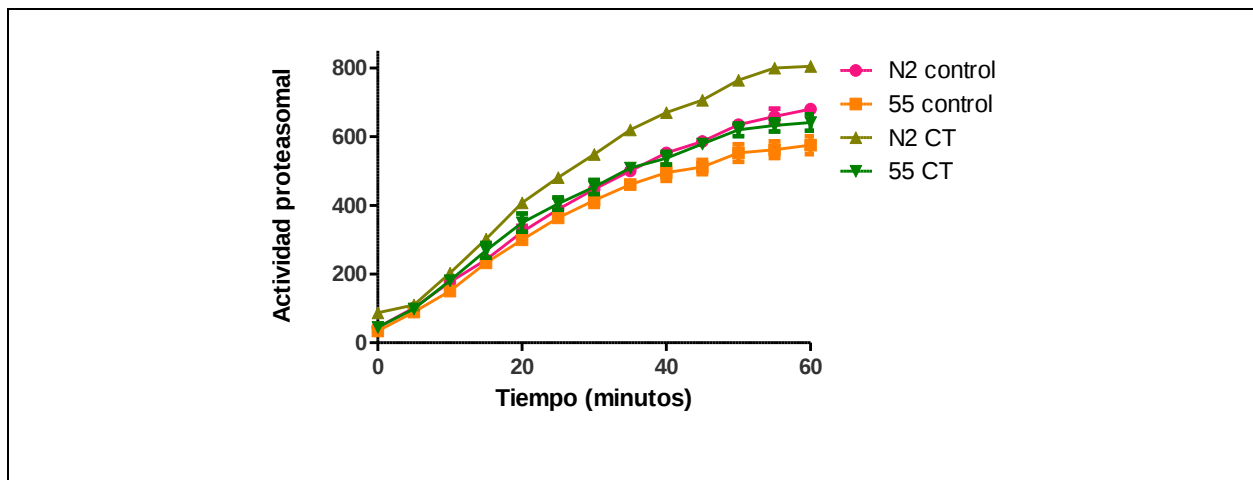


Figura 26. Ensayo de actividad proteasomal (tipo quimiotripsina) en muestras de *C. elegans* cepa N2 y 55, sometidas a un choque térmico (CT) de 33 °C por 1 hora en el día 1 de vida adulta. Las muestras se procesaron 24 horas post-CT.

CAPÍTULO IV: Discusión y conclusiones

Las proteínas son biomoléculas esenciales que llevan a cabo diversas funciones que preservan la vida. Para mantenerse biológicamente activas, deben conservarse en estado soluble con una conformación tridimensional apropiada. Está bien documentado que la generación y acumulación de agregados de proteínas específicas durante el proceso de envejecimiento aumenta la susceptibilidad a padecer enfermedades como el Alzheimer, Parkinson, Huntington y diabetes tipo II [14,52]. Por lo que la agregación proteica ha sido asociada principalmente a patologías. Sin embargo, ahora se sabe que una gran variedad de proteínas podrían tener la capacidad de agregarse, incluso bajo condiciones fisiológicas [16], especialmente aquellas que contienen conformaciones o secuencias aminoacídicas que las hacen más susceptibles [126].

En este sentido, existe un tipo de agregados proteicos, conocidos como amiloides, que poseen características estructurales y bioquímicas comunes, las cuales han sido explotadas para su identificación y caracterización [30]. Dichos agregados se agrupan en estructuras oligoméricas insolubles con una conformación en hoja β -plegada, la cual les confiere la capacidad de unirse a colorantes como la tioflavina y a ciertos anticuerpos conformacionales. Adicionalmente, dicho arreglo estructural les aporta una incrementada resistencia a la digestión proteica [127]. Todas estas características son compartidas e independientes de la secuencia. Se ha demostrado además que virtualmente se puede inducir a cualquier proteína para la formación de amiloides, lo cual lleva a especular que la conformación amiloide es una forma primordial y altamente estable de los polipéptidos [15,16,126].

A pesar de que múltiples factores tienen influencia en el envejecimiento, la evidencia sugiere que existe una relación entre la acumulación de proteínas dañadas y el envejecimiento [19–21,27]. De tal manera que se decidieron realizar estudios de la agregación proteica en el envejecimiento como

estrategia para elucidar su posible rol en dicho proceso. En la primera parte de este trabajo se realizó el aislamiento, detección y caracterización de los agregados proteicos generados en el envejecimiento. Los resultados demuestran que durante el envejecimiento natural en distintos modelos existe una acumulación progresiva de distintas proteínas insolubles, resistentes a la degradación, reactivas a la tioflavina y a anticuerpos conformacionales dirigidos para la detección de amiloides (**Tabla 4**). Por lo anterior, se sugiere que durante el envejecimiento diversas proteínas se acumulan en forma de agregados de tipo amiloide. El hecho de que los resultados son similares en los modelos utilizados sugiere que la acumulación de agregados proteicos podría tratarse de un proceso conservado, y por lo tanto, sería interesante analizar muestras humanas para determinar si es posible extrapolar los resultados al proceso de envejecimiento natural en nuestra especie, así como realizar el análisis proteómico para identificar las proteínas que se agregan con la edad.

Tabla 4. Evidencia de la acumulación de agregados amiloides durante el envejecimiento en distintos modelos. ND: no hay diferencia; NC: no concluyente; las flechas indican el incremento de cada parámetro en las muestras envejecidas.

Modelo	Insolubilidad	Resistencia a la digestión	Reactividad a tioflavina	Reactividad a anticuerpos conformacionales
<i>C. elegans</i>	↑	↑	↑	↑ (A11 y OC)
FEMs	↑	↑	↑	↑ (A11 y OC)
Cerebro	↑	↑	↑	↑ (A11)
Corazón	↑	↑	↑	↑ (A11)
Hígado	ND	ND	ND	↑ (A11)
Intestino	ND	ND	ND	NC

En el caso del modelo de ratón, se encontró que los agregados se acumulan de manera diferencial en distintos tejidos. El cerebro y el corazón fueron los órganos en los que se encontraron incrementos significativos y progresivos durante el envejecimiento, mientras que en el hígado y el intestino no se registraron cambios significativos. El cerebro y el corazón se encuentran

constituidos por una proporción de células postmitóticas (neuronas y cardiomiocitos, respectivamente). Dichas células carecen de capacidad proliferativa y probablemente debido a esa característica, son más propensas a acumular proteínas dañadas con el paso del tiempo, haciendo que esos órganos sean más susceptibles a presentar alteraciones funcionales durante el envejecimiento. En cambio, el hígado y el intestino son órganos cuyas células son proliferativas, con una alta capacidad mitótica, lo que permite la regeneración de las células dañadas. Lo anterior podría explicar el hecho de que no fue posible detectar diferencia en la agregación proteica en esas muestras. Otra posible explicación es que las condiciones microambientales o los mecanismos de proteostasis en dichos órganos no favorecen a la acumulación de agregados, como se ha reportado en estudios previos [128]. La evidencia anterior sugiere que no todos los tejidos envejecen a la misma velocidad. Reportes previos indican que no existe uniformidad en el proceso de envejecimiento, la tasa y magnitud de los cambios varían dependiendo de la célula, tejido, órgano o sistema estudiado. El envejecimiento es un proceso continuo, por lo tanto, algunos de sus efectos pueden ser observados únicamente cuando han avanzado lo suficiente para ser identificados y validados por las técnicas disponibles [129]. En el caso del cerebro, se han documentado cambios estructurales con el envejecimiento, tales como reducción del tamaño y volumen, pérdida de cuerpos neuronales, acumulación de lipofucsina, reducción en la densidad sináptica, pérdida de espinas dendríticas, daño mitocondrial, reducción en la capacidad de reparación del DNA, etc. [130]. La evidencia indica que el cerebro es un órgano especialmente susceptible a sufrir daños relacionados con la edad, una de las causas es su reducido nivel basal de actividad proteasomal además de su alta vulnerabilidad a los efectos tóxicos de algunos inhibidores del proteasoma. Dicha inhibición podría promover desequilibrios en la homeostasis celular y contribuir a la acumulación de proteínas alteradas [23]. En cambio, el hígado posee un nivel mayor de actividad

proteasomal, lo cual promueve la habilidad del mismo para remover proteínas dañadas. Adicionalmente, se ha reportado que los proteasomas hepáticos son más resistentes a la inhibición [128]. Por otra parte, el corazón envejecido presenta un engrosamiento progresivo de la pared ventricular, reducción en el número de cardiomiocitos debida a apoptosis, alteraciones morfológicas en los cardiomiocitos causadas por hipertrofia y un incremento en los niveles de colágeno [131]. Durante el envejecimiento, la red de proteostasis de los cardiomiocitos se ve afectada, los niveles de expresión de las proteínas de choque térmico disminuyen, hay cambios mitocondriales que generan un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno que a su vez generan daño proteico y estimulan la formación de lipofucsina, lo cual que afecta negativamente a la autofagia al prevenir la fusión de los lisosomas con los autofagosomas. A su vez, las alteraciones en la autofagia dañan al sistema ubiquitina-proteasoma. Lo anterior hace que los cardiomiocitos sean células susceptibles al daño celular durante el envejecimiento [132]. De tal manera que los cambios más pronunciados relacionados con la edad, ocurren en células postmitóticas de vida larga, tales como neuronas o cardiomiocitos. Dichas células son altamente vulnerables debido en parte a su intenso metabolismo oxidativo y al hecho de que no pueden ser reemplazadas. En contraste, las células mitóticas (como las del hígado o intestino) no acumulan daños substanciales [133].

La evidencia de la acumulación de agregados amiloides durante el envejecimiento en distintos modelos lleva a proponer que la transición de ciertas proteínas de un estado soluble a uno insoluble puede deberse a cambios conformacionales específicos en las mismas, resultando en un plegamiento no adecuado que conlleva a una mayor propensión a la agregación, al exponer regiones que normalmente no deberían estar expuestas. Probablemente, con el paso del tiempo, aquellas proteínas que presentan una tendencia intrínseca a la agregación amiloide (ya sea por su

secuencia o por su conformación) [126], sufren plegamientos anómalos debido a cambios en las condiciones fisiológicas de las células envejecidas (transiciones de pH, cambios en condiciones iónicas, falla en los sistemas de control de calidad y degradación de proteínas, etc.) [16]. Hoy en día se sabe que las células senescentes secretan una serie de moléculas (SASP, fenotipo secretorio asociado a la senescencia) que alteran el microambiente extra e intracelular, favoreciendo el proceso de senescencia [134], lo cual pudiera disparar el fenómeno de agregación amiloide como se ha observado en el caso de la enfermedad de Alzheimer o diabetes tipo II [135], y se sugiere que además podría afectar a otras proteínas con tendencia a la agregación. Lo anterior lleva a proponer tres posibles escenarios que pudieran o no generarse simultáneamente durante el envejecimiento y que explicarían la mayor vulnerabilidad a enfermedades, factores ambientales y muerte. El primero incluye la pérdida de la función de las proteínas dañadas contenidas en los agregados, ya que al sufrir alteraciones conformacionales perderían su función biológica, además de quedar secuestradas, impidiéndoles cumplir con sus tareas, como sucede en algunas formas familiares de la enfermedad de Parkinson en las que la ubiquitin-ligasa E3 pierde su función catalítica al plegarse anormalmente [136]. Cientos de proteínas distintas podrían quedar atrapadas, lo cual resultaría en efectos devastadores para la célula, especialmente si dichas proteínas se encuentran involucradas en procesos clave. El fenómeno de autopropagación de los agregados amiloides pudiera jugar un rol en la diseminación de la agregación durante el envejecimiento. Se ha reportado que los agregados amiloides formados localmente pueden propagarse por los tejidos y afectar a una diversidad de proteínas [114], como en el caso de las amiloidosis secundarias, en las que al inyectar agregados no relacionados con la enfermedad se logró inducir la agregación de la proteína amiloide A sérica en un modelo de ratón [137,138]. El segundo escenario implica la ganancia de toxicidad de los agregados generados, pues está bien documentado que los agregados

amiloides, debido a sus características fisicoquímicas, actúan de manera promiscua e interactúan con múltiples receptores, activando diversas rutas de señalización. Adicionalmente se sabe que pueden insertarse en las membranas celulares y formar poros que resultan devastadores para la célula [136,139]. En el tercer escenario propuesto, las proteínas con un plegamiento inadecuado podrían potencialmente incrementar el daño, acumulación y agregación de otras proteínas al dañar la red de proteostasis, ya sea al sobresaturar los sistemas de reparación y degradación, como el proteasoma y la autofagia, o bien al inducir la agregación de las proteínas involucradas en la red. En este sentido, estudios previos en nemátodos y levadura han demostrado que dentro del grupo de proteínas que se vuelven insolubles durante el envejecimiento existe una representación de algunas que se encuentran involucradas en la red de homeostasis proteica (proteasoma, chaperonas y proteínas de choque térmico) [19,20]. Al realizar el silenciamiento por iRNA de algunas de estas proteínas fue posible extender la longevidad de *C. elegans* [19], indicando que las proteínas que se vuelven insolubles podrían jugar un rol fundamental en el proceso de regulación del envejecimiento cronológico y biológico. Se sabe también que ciertos agregados amiloides pueden inhibir y bloquear el proteasoma [140], así como alterar la cascada de autofagia, causando disfunción mitocondrial, producción de radicales libres y muerte celular [141]. Adicionalmente, las proteínas asociadas a agregados amiloides presentan una mayor resistencia a la digestión [142], impidiendo así su degradación, lo cual favorece a su acumulación.

Una vez realizada la detección y caracterización de los agregados generados durante el envejecimiento, el siguiente paso consistió en determinar si juegan un rol en el mismo y no eran una mera consecuencia. Por lo tanto, se manipuló la agregación para observar su efecto en el envejecimiento. Se usaron dos estrategias, la primera fue de tipo farmacológica y consistió en la utilización *in vivo* de compuestos inhibidores de la agregación proteica con el objetivo de generar

una reducción/disgregación de los agregados. La segunda implicó la manipulación de la proteostasis en la que se buscó incrementar la maquinaria de degradación de proteínas agregadas al expresar el proteasoma arqueano en *C. elegans*. Si los agregados generados durante el envejecimiento, juegan un rol activo en el proceso, se observaría un incremento en la longevidad al inhibir la producción de los mismos o al favorecer su degradación.

Para la manipulación farmacológica, se seleccionó a la miricetina, quinacrina, lacmoide, rodanina, negro de clorazol, ANSA y curcumina, que son compuestos que comparten la capacidad de unirse e inhibir distintas proteínas implicadas en desórdenes del plegamiento proteico, debido a sus características estructurales y/o fisicoquímicas. El mecanismo preciso de acción de los mismos se desconoce, sin embargo, la evidencia obtenida a través de ensayos libres de células y estudios de dinámica molecular, sugiere que reconocen de manera directa a las conformaciones asociadas con los agregados amiloides, en lugar de una secuencia particular de aminoácidos [34–38]. Esa característica los hace óptimos para probar su efecto en el envejecimiento, donde varias proteínas parecen agregarse. Por ejemplo, la miricetina [38,40,41], quinacrina [39], curcumina [39,42,43] y lacmoide son inhibidores de la agregación de la proteína β -amiloide y tau. La rodanina y negro de clorazol causan disociación de los agregados de α -sinucleína y tau, respectivamente [35,40,44]. La quinacrina inhibe también la generación de la forma agregada e infecciosa de la proteína priónica y se ha probado en ensayos clínicos para el tratamiento de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob [45]. A pesar de que no hay estudios que demuestren que el ANSA puede actuar como un inhibidor de la agregación proteica, se ha reportado que se une a las regiones hidrofóbicas de las especies oligoméricas prefibrilares de la proteína β -amiloide y es ampliamente utilizado para identificar cambios conformacionales en las proteínas [46,47].

Los compuestos probados en medio sólido prolongaron la sobrevivencia promedio de *C. elegans* en un rango de 12 a 34% y la sobrevivencia máxima de 11 a 33%. A pesar de que se desconoce el mecanismo preciso de su acción antienvjecimiento, la única característica común que comparten es su capacidad para prevenir la formación de agregados proteicos, por lo tanto, este trabajo sugiere que su efecto en el envejecimiento es dependiente de la inhibición del plegamiento anormal y agregación proteica. La inhibición pudiera llevarse a cabo a través de interacciones directas, lo cual incluye la prevención de la formación de agregados, el bloqueo de los intermediarios de la agregación, disociación de agregados maduros o estimulación del plegamiento proteico. Además, no se puede descartar la posibilidad de otros mecanismos moleculares en los cuales los compuestos podrían estar afectando elementos de la autofagia, proteasoma o el sistema endógeno de chaperonas. Adicionalmente, algunos de los compuestos probados han sido descritos como antioxidantes o antiinflamatorios [143–145], lo cual podría contribuir también al efecto observado. De tal forma que en un futuro es preciso caracterizar su mecanismo de acción *in vivo* para determinar si el incremento de longevidad y salud son debidos a una acción directa en la agregación proteica. Para llevar a cabo lo anterior, sería interesante probar el efecto de los compuestos seleccionados en ciertas líneas mutantes de *C. elegans*, como aquella que expresa proteínas fluorescentes con repeticiones de glutamina [146]. Es necesario estudiar también su efecto al administrarse en etapas tardías de la vida, para determinar si pudieran revertir el proceso del envejecimiento. Ya que las rutas moleculares implicadas en el envejecimiento se encuentran conservadas entre invertebrados y organismos superiores, es importante también estudiar el efecto antienvjecimiento de estos compuestos en modelos de mamíferos.

Este estudio ejemplifica que es posible prolongar la longevidad en conjunto con la salud. Está bien documentado que la faringe de *C. elegans* exhibe una disminución funcional y sus contracciones

se reducen durante el envejecimiento, como consecuencia de una sarcopenia progresiva [147]. Los resultados presentados indican que los nemátodos expuestos a los compuestos inhibidores de la agregación presentan un retraso en la tasa de disminución de bombeo faríngeo, lo cual sugiere un buen estado de salud. Una posible explicación es que los compuestos inhiben la agregación proteica en el tejido muscular, haciéndolo menos susceptible a alteraciones funcionales causadas por el secuestro de proteínas en los agregados. En resumen, el tratamiento con inhibidores de la agregación durante la vida adulta en *C. elegans*, permitió a los nemátodos vivir más tiempo y en un buen estado de salud. Por lo tanto, el entendimiento de los mecanismos de acción de los compuestos probados, es fundamental para el desarrollo de inhibidores que prevengan o retrasen el envejecimiento. Actualmente, existen distintas herramientas que son de utilidad para llevar a cabo la búsqueda de compuestos que modifiquen la tasa de envejecimiento, por ejemplo, el uso de bibliotecas combinatorias, estudios de estructura-actividad o generación de modelos farmacofóricos. Por lo que este estudio puede servir como base para el diseño de terapias antienvejecimiento y abre un campo para el desarrollo de intervenciones terapéuticas.

Como se mencionó anteriormente, el siguiente paso consistió en incrementar la degradación de proteínas agregadas para observar su efecto en el envejecimiento. Es bien sabido que la regulación de la proteostasis juega un rol esencial en la prevención y/o degradación de la agregación proteica [50]. Al inicio, los mecanismos de plegamiento y degradación logran controlar el problema, sin embargo con el paso del tiempo dichos sistemas se vuelven menos eficientes y su actividad se ve gravemente comprometida, resultando en la atenuación de la proteostasis celular [148]. La evidencia indica que al incrementar la maquinaria de plegamiento o degradación, es posible observar un efecto benéfico y protector contra diversas enfermedades relacionadas con la formación y acumulación de agregados proteicos. Además, al activar algunos de los componentes

de la red de proteostasis es posible alterar el envejecimiento. Por ejemplo, al sobreexpresar la maquinaria de plegamiento proteico en levadura [149] y al estimular farmacológicamente la autofagia en ratón [29] se observó un incremento de la longevidad. Por otro lado, el silenciamiento genético de la respuesta de choque térmico y las chaperonas moleculares suprimieron la longevidad en mutantes de larga vida de *C. elegans* [150].

El proteasoma es uno de los componentes básicos para la degradación de proteínas dañadas, por lo que es fundamental para permitir el funcionamiento adecuado de la célula al remover proteínas que podrían ser dañinas. Las evidencias recientes tanto en *C. elegans* como en células embrionarias humanas [27,84] indican que la activación del mismo a través de métodos genéticos contribuye de manera significativa al incremento de la resistencia al estrés proteotóxico, ya que la sobreexpresión de algunas subunidades regulatorias permitió su estimulación y retrasó los efectos perjudiciales ante condiciones adversas. A través de estudios proteómicos se ha sugerido también que cambios en la expresión de las subunidades proteasomales durante el envejecimiento podrían explicar la susceptibilidad a padecer enfermedades relacionadas con el plegamiento proteico anormal [151]. Lo anterior da evidencia de que el proteasoma es un excelente blanco para manipular el envejecimiento, debido a la importancia que tiene dentro de los procesos de regulación de la proteostasis celular. Sin embargo, hay que ser cuidadosos ya que una activación descontrolada o en una etapa de vida no adecuada, pudiera generar consecuencias adversas para los organismos. Se ha demostrado que el proteasoma arqueano tiene preferencia para la degradación de agregados proteicos [92,93], lo cual fue un factor decisivo para su utilización en este trabajo, además del hecho de su simplicidad estructural y capacidad de ensamblarse y funcionar sin la necesidad de factores regulatorios adicionales. Para este estudio se seleccionó expresar el proteasoma arqueano bajo el control de un promotor inducible que permitiera su regulación durante distintas etapas de

la vida de *C. elegans*. Se generó un plásmido de expresión para las subunidades del proteasoma arqueano, se inyectó e integró en *C. elegans*, se probaron distintos regímenes de inducción y se seleccionó el que generó una mayor expresión, los nemátodos se sometieron a dicho régimen y se midió la actividad proteasomal. Lamentablemente, los resultados obtenidos no fueron satisfactorios, ya que al parecer el tratamiento generó un efecto tóxico en los nemátodos, ejemplificado por un incremento en la mortalidad, lo cual evitó el análisis de la longevidad en la línea transgénica generada. Adicionalmente, no fue posible detectar un incremento en la actividad proteasomal al comparar los nemátodos transgénicos con sus respectivos controles. Los resultados obtenidos pueden interpretarse de varias formas, ya que el método de integración utilizado se basa en un proceso estocástico, dependiente de la ruptura del DNA y activación de los mecanismos de reparación al someter a los nemátodos a radiación UV en presencia de TMP. Si bien se confirmó por PCR, RT-PCR y western blot, la presencia y la expresión de la información insertada, no se determinó si los niveles de expresión obtenidos fueron los necesarios para producir un efecto en la actividad proteasomal, lo cual puede explicar por qué no se observó un incremento en la misma. Adicionalmente, bajo las condiciones del método de integración seleccionado es posible inducir mutaciones indeseadas, lo cual explicaría la mortalidad observada en la línea transgénica. Los reportes indican que el proteasoma arqueano tiene capacidad de autoensamblaje y no requiere factores regulatorios al expresarlo en células de mamífero [88], sin embargo no se determinó si esto sucede también en el modelo de *C. elegans*, en donde probablemente no se presentan las condiciones adecuadas para su actividad. Finalmente, el método de expresión utilizado pudo no haber sido el óptimo para observar un incremento en la actividad proteasomal debido a limitaciones en el modelo de *C. elegans*, donde está reportado que temperaturas mayores a 33 °C generan alteraciones no deseadas en el nemátodo [152]. De tal manera que debido a lo mencionado,

no fue posible analizar el envejecimiento en un contexto de aceleración de la degradación de la agregación proteica. Interesantemente, se observó que el choque térmico indujo un incremento en la actividad proteasomal en ambas cepas. Al respecto, existen reportes que indican un potenciamiento en la proteólisis asociada a la actividad del proteasoma ante aumentos de temperatura [153]. La actividad del factor de choque térmico 1 (HSF1) aumenta como respuesta al estrés térmico [154]. En su estado inactivo, el HSF1 forma un complejo con las proteínas de choque térmico 70 y 90 (Hsp70, Hsp90). Durante el estrés térmico, dichas proteínas se disocian del HSF1 para cumplir con sus funciones [155]. El Hsp70 aumenta la actividad proteasomal al participar en su ensamblaje y en el reclutamiento de proteínas para su degradación, lo cual podría explicar el aumento en la actividad proteasomal posterior al choque térmico [156][157].

De los resultados obtenidos se concluye que en las muestras envejecidas de *C. elegans*, FEMs, cerebro y corazón de ratón se observó un incremento en la insolubilidad proteica, reactividad a tioflavina proveniente de la unión a proteínas, reactividad a anticuerpos para la detección de amiloides y resistencia a la digestión proteica. Adicionalmente, el uso de compuestos inhibidores de la agregación permitió la extensión de la vida y retraso en el deterioro del estado de salud de *C. elegans* durante el envejecimiento. En conclusión, la caracterización de la naturaleza de la agregación proteica en distintos modelos y el estudio del efecto de la inhibición de la agregación en el envejecimiento, da evidencia de que existe un incremento en la agregación proteica amiloide de distintas proteínas durante el tiempo y que dicho fenómeno juega un rol en el envejecimiento y no parece ser una simple consecuencia del mismo. Los resultados obtenidos llevan a la propuesta de un modelo (**Figura 27**, panel A) en el que las células sufren una serie de alteraciones o daños durante el envejecimiento, lo cual incrementa la probabilidad de que una gran variedad de proteínas cambien su conformación y formen agregados amiloides, cuya acumulación causaría un

incremento en la disfunción celular originada por la pérdida de la función y/o ganancia de toxicidad de las proteínas involucradas, además de generar alteraciones en la red de proteostasis. Por lo cual, las intervenciones dirigidas al mantenimiento o estimulación de la homeostasis proteica, la inhibición directa de la agregación o la degradación de los agregados proteicos pudieran ser una herramienta terapéutica importante para prevenir o retrasar el envejecimiento (**Figura 27**, panel B).

IV. 1 Perspectivas

La información presentada en este trabajo sienta un precedente en el estudio del rol de la agregación proteica inherente durante el envejecimiento y puede servir como base para el estudio específico de los mecanismos de agregación y la generación de estrategias terapéuticas para extender los años de vida activa y salud. Los resultados sugieren que durante el envejecimiento distintas proteínas se agregan de manera diferencial en distintos órganos, por lo que en el futuro es necesario realizar la identificación de las mismas, por ejemplo, a través de espectrometría de masas. Dicho análisis permitiría realizar su clasificación funcional y determinar cuáles son los procesos que se afectan durante el envejecimiento, lo que contribuiría para lograr un mejor entendimiento del mismo y permitir el diseño de terapias órgano-dirigidas.

Si bien en este trabajo la manipulación de la proteostasis como estrategia para retrasar el envejecimiento no fue exitosa, se propone que la manipulación de otras rutas de la red, tales como la autofagia, podría resultar en una remoción exitosa de los agregados proteicos y permitir la extensión de la vida.

Se sabe que ciertos agregados amiloides tienen la capacidad de propagarse, por lo que queda por determinar si es que los agregados proteicos generados durante el envejecimiento poseen dicha

capacidad tanto *in vitro* como *in vivo*. Es preciso además realizar la caracterización de la agregación proteica en muestras humanas de distintas edades para determinar si lo reportado en este trabajo se extrapola a nuestra especie.

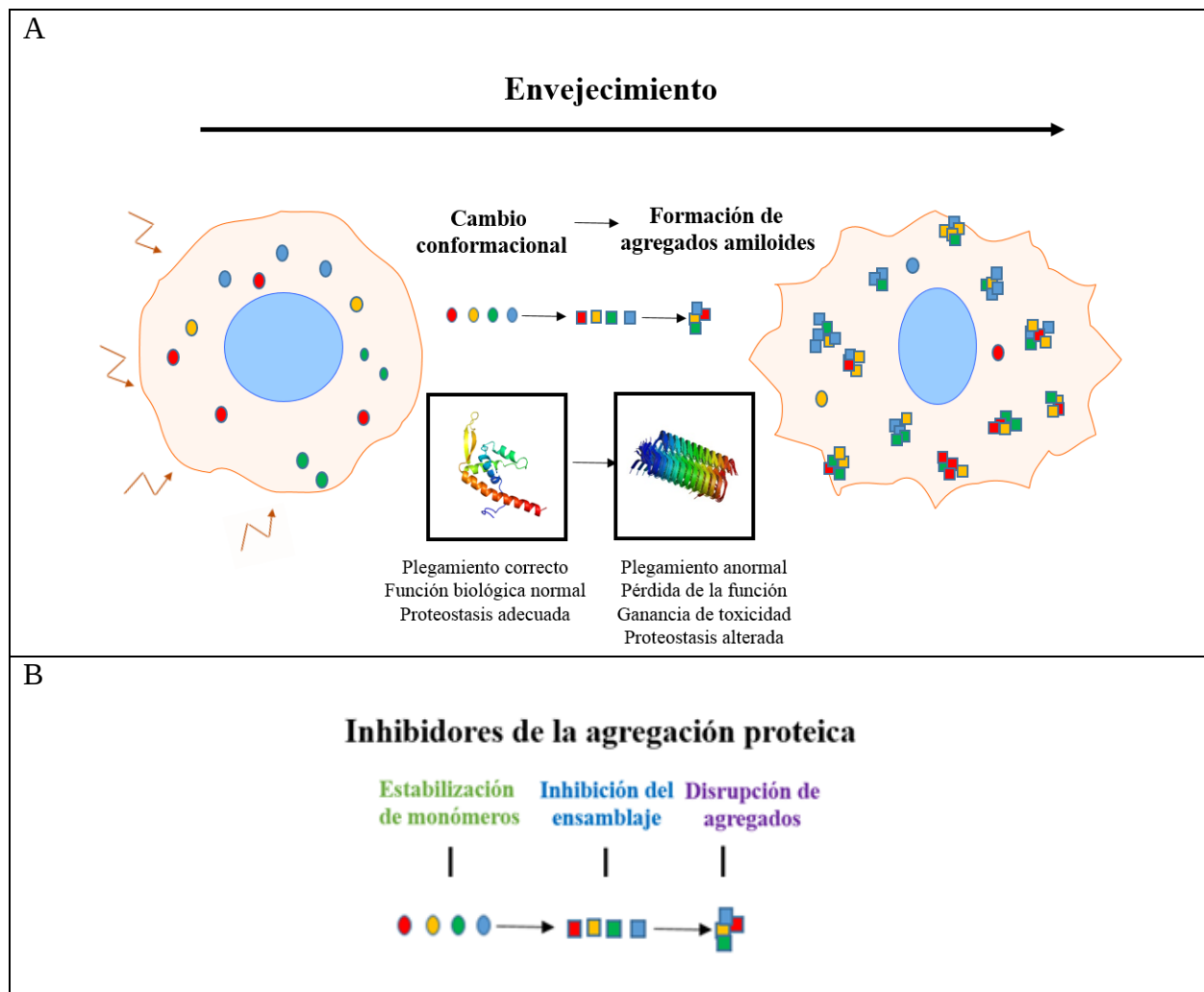


Figura 27. Modelo propuesto del rol de los agregados proteicos durante el envejecimiento. A)

Las células sufren una serie de daños (flechas naranjas) a través del tiempo, tales como alteraciones en el pH, cambios en concentraciones de iones, cambios de temperatura, etc. Dichas alteraciones incrementan la posibilidad de que una gran variedad de proteínas solubles y correctamente plegadas (círculos de colores) sufran cambios conformacionales que las hacen propensas a la formación de agregados amiloides (cuadrados de colores). Dichos agregados se acumulan durante el envejecimiento causando alteraciones en la función celular, mayor susceptibilidad a enfermedades, factores ambientales y un incremento en el riesgo de muerte; B) el uso de inhibidores del proceso de agregación proteica es una estrategia terapéutica interesante que pudiera prevenir o retrasar la disfunción celular observada en el envejecimiento.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] WHO | Ageing and life-course, WHO. (2016).
- [2] L. De, E. Salud, R. México, M. Ham-Chande, E.M. En, M. En, EL ENVEJECIMIENTO: UNA NUEVA DIMENSIÓN, 38 (1996).
- [3] S. Ostojić, N. Perez, M. Kapović, A current genetic and epigenetic view on human aging mechanisms., *Coll. Antropol.* 33 (2009) 687–699.
- [4] V. Vanhooren, C. Libert, The mouse as a model organism in aging research: Usefulness, pitfalls and possibilities, *Ageing Res. Rev.* 12 (2013) 8–21.
- [5] Welcome to the Digital Ageing Atlas, the portal of ageing related changes | The Digital Ageing Atlas, (n.d.).
- [6] Z.A. Medvedev, An attempt at a rational classification of theories of ageing., *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 65 (1990) 375–398.
- [7] J. Viña, C. Borrás, J. Miquel, Theories of ageing., *IUBMB Life.* 59 (n.d.) 249–254.
- [8] N. Tavernarakis, ed., *Protein Metabolism and Homeostasis in Aging*, Springer US, Boston, MA, 2010.
- [9] S. Gonzalo, Epigenetic alterations in aging., *J. Appl. Physiol.* 109 (2010) 586–597.
- [10] V.D. Longo, B.K. Kennedy, Sirtuins in aging and age-related disease., *Cell.* 126 (2006) 257–268.
- [11] V.M. Mikhel'son, I.A. Gamaleï, [Telomere shortening is the main mechanism of natural and radiation aging]., *Radiatsionnaia Biol. Radioecol. / Ross. Akad. Nauk.* 50 (n.d.) 269–275.
- [12] C.M. Gomes, Protein misfolding in conformational disorders., *Curr. Top. Med. Chem.* 12 (2012) 2459.
- [13] F. Chiti, C.M. Dobson, Protein misfolding, functional amyloid, and human disease., *Annu. Rev. Biochem.* 75 (2006) 333–366.
- [14] I. Moreno-Gonzalez, C. Soto, Misfolded protein aggregates: mechanisms, structures and potential for disease transmission., *Semin Cell Dev Biol.* 22 (2011) 482–487.
- [15] J.I. Gujjarro, M. Sunde, J.A. Jones, I.D. Campbell, C.M. Dobson, Amyloid fibril formation by an SH3 domain., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 4224–4228.
- [16] F. Chiti, C.M. Dobson, Amyloid formation by globular proteins under native conditions, *Nat. Chem. Biol.* 5 (2009) 15–22.
- [17] S. V Litvinovich, S.A. Brew, S. Aota, S.K. Akiyama, C. Haudenschild, K.C. Ingham, Formation of amyloid-like fibrils by self-association of a partially unfolded fibronectin type III module., *J. Mol. Biol.* 280 (1998) 245–258.
- [18] E.A. Kikis, T. Gidalevitz, R.I. Morimoto, Protein Homeostasis in Models of Aging and Age-Related Conformational Disease, in: 2010: pp. 138–159.
- [19] D.C. David, N. Ollikainen, J.C. Trinidad, M.P. Cary, A.L. Burlingame, C. Kenyon, Widespread protein aggregation as an inherent part of aging in *C. elegans*., *PLoS Biol.* 8 (2010) e1000450.
- [20] P. Reis-Rodrigues, G. Czerwieniec, T.W. Peters, U.S. Evani, S. Alavez, E.A. Gaman, M. Vantipalli, S.D. Mooney, B.W. Gibson, G.J. Lithgow, R.E. Hughes, Proteomic analysis of age-dependent changes in protein solubility identifies genes that modulate lifespan., *Aging Cell.* 11 (2012) 120–127.
- [21] T.W. Peters, M.J. Rardin, G. Czerwieniec, U.S. Evani, P. Reis-Rodrigues, G.J. Lithgow, S.D. Mooney, B.W. Gibson, R.E. Hughes, Tor1 regulates protein solubility in

- Saccharomyces cerevisiae*., *Mol. Biol. Cell.* 23 (2012) 4679–4688.
- [22] A. Hallén, Accumulating insoluble protein and rate of aging., *Rejuvenation Res.* 11 (2008) 445–447.
 - [23] K. Dasuri, P. Ebenezer, L. Zhang, S.O. Fernandez-Kim, A.J. Bruce-Keller, W.R. Markesbery, J.N. Keller, Increased protein hydrophobicity in response to aging and Alzheimer disease., *Free Radic. Biol. Med.* 48 (2010) 1330–1337.
 - [24] F. Demontis, N. Perrimon, FOXO/4E-BP signaling in *Drosophila* muscles regulates organism-wide proteostasis during aging., *Cell.* 143 (2010) 813–825.
 - [25] S. Alavez, M.C. Vantipalli, D.J.S. Zucker, I.M. Klang, G.J. Lithgow, Amyloid-binding compounds maintain protein homeostasis during ageing and extend lifespan., *Nature.* 472 (2011) 226–229.
 - [26] A. Tonoki, E. Kuranaga, T. Tomioka, J. Hamazaki, S. Murata, K. Tanaka, M. Miura, Genetic evidence linking age-dependent attenuation of the 26S proteasome with the aging process., *Mol. Cell. Biol.* 29 (2009) 1095–1106.
 - [27] D. Vilchez, I. Morante, Z. Liu, P.M. Douglas, C. Merkwirth, A.P.C. Rodrigues, G. Manning, A. Dillin, RPN-6 determines *C. elegans* longevity under proteotoxic stress conditions., *Nature.* 489 (2012) 263–268.
 - [28] S. Robida-Stubbs, K. Glover-Cutter, D.W. Lamming, M. Mizunuma, S.D. Narasimhan, E. Neumann-Haefelin, D.M. Sabatini, T.K. Blackwell, TOR signaling and rapamycin influence longevity by regulating SKN-1/Nrf and DAF-16/FoxO., *Cell Metab.* 15 (2012) 713–724.
 - [29] D.E. Harrison, R. Strong, Z.D. Sharp, J.F. Nelson, C.M. Astle, K. Flurkey, N.L. Nadon, J.E. Wilkinson, K. Frenkel, C.S. Carter, M. Pahor, M.A. Javors, E. Fernandez, R.A. Miller, Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice., *Nature.* 460 (2009) 392–395.
 - [30] C. Duran-Aniotz, I. Moreno-Gonzalez, R. Morales, Agregados amiloides: rol en desórdenes de conformación proteica, *Rev. Med. Chil.* 141 (2013) 495–505.
 - [31] C. Soto, Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases., *Nat. Rev. Neurosci.* 4 (2003) 49–60.
 - [32] R. Morales, K.M. Green, C. Soto, Cross currents in protein misfolding disorders: interactions and therapy., *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 8 (2009) 363–371.
 - [33] C. Soto, Protein misfolding and disease; protein refolding and therapy, *Febs Lett.* 498 (2001) 204–207.
 - [34] C. Lendel, C.W. Bertocini, N. Cremades, C.A. Waudby, M. Vendruscolo, C.M. Dobson, D. Schenk, J. Christodoulou, G. Toth, On the mechanism of nonspecific inhibitors of protein aggregation: dissecting the interactions of alpha-synuclein with Congo red and lacmoid., *Biochemistry.* 48 (2009) 8322–8334.
 - [35] J.N. Rao, V. Dua, T.S. Ulmer, Characterization of alpha-synuclein interactions with selected aggregation-inhibiting small molecules., *Biochemistry.* 47 (2008) 4651–4656.
 - [36] M. Landau, M.R. Sawaya, K.F. Faull, A. Laganowsky, L. Jiang, S.A. Sievers, J. Liu, J.R. Barrio, D. Eisenberg, Towards a pharmacophore for amyloid., *PLoS Biol.* 9 (2011) e1001080.
 - [37] S.A. Sievers, J. Karanicolas, H.W. Chang, A. Zhao, L. Jiang, O. Zirafi, J.T. Stevens, J. Münch, D. Baker, D. Eisenberg, Structure-based design of non-natural amino-acid inhibitors of amyloid fibril formation., *Nature.* 475 (2011) 96–100.
 - [38] S. Taniguchi, N. Suzuki, M. Masuda, S. Hisanaga, T. Iwatsubo, M. Goedert, M.

- Hasegawa, Inhibition of heparin-induced tau filament formation by phenothiazines, polyphenols, and porphyrins., *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 7614–7623.
- [39] M. Necula, R. Kayed, S. Milton, C.G. Glabe, Small-molecule inhibitors of aggregation indicate that amyloid beta oligomerization and fibrillization pathways are independent and distinct, *J.Biol.Chem.* (2007).
- [40] B. Bulic, M. Pickhardt, E.-M. Mandelkow, E. Mandelkow, Tau protein and tau aggregation inhibitors., *Neuropharmacology.* 59 (n.d.) 276–289.
- [41] Y. Porat, A. Abramowitz, E. Gazit, Inhibition of amyloid fibril formation by polyphenols: structural similarity and aromatic interactions as a common inhibition mechanism., *Chem Biol Drug Des.* 67 (2006) 27–37.
- [42] F. Yang, G.P. Lim, A.N. Begum, O.J. Ubeda, M.R. Simmons, S.S. Ambegaokar, P.P. Chen, R. Kayed, C.G. Glabe, S.A. Frautschy, G.M. Cole, Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo., *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 5892–5901.
- [43] K. Cisek, G.L. Cooper, C.J. Huseby, J. Kuret, Structure and mechanism of action of tau aggregation inhibitors., *Curr. Alzheimer Res.* 11 (2014) 918–927.
- [44] B. Bulic, M. Pickhardt, I. Khlistunova, J. Biernat, E.-M. Mandelkow, E. Mandelkow, H. Waldmann, Rhodanine-Based Tau Aggregation Inhibitors in Cell Models of Tauopathy, *Angew. Chemie Int. Ed.* 46 (2007) 9215–9219.
- [45] A. Barret, F. Tagliavini, G. Forloni, C. Bate, M. Salmona, L. Colombo, A. De Luigi, L. Limido, S. Suardi, G. Rossi, F. Auvré, K.T. Adjou, N. Salès, A. Williams, C. Lasmézas, J.P. Deslys, Evaluation of quinacrine treatment for prion diseases., *J Virol.* 77 (2003) 8462–8469.
- [46] B. Bolognesi, J.R. Kumita, T.P. Barros, E.K. Esbjorner, L.M. Luheshi, D.C. Crowther, M.R. Wilson, C.M. Dobson, G. Favrin, J.J. Yerbury, ANS binding reveals common features of cytotoxic amyloid species., *ACS Chem. Biol.* 5 (2010) 735–740.
- [47] T. Yoshimura, Monitoring protein conformational changes during membrane fusion, *Methods Enzymol.* 221 (1993) 72–82.
- [48] E. Wong, A.M. Cuervo, Integration of clearance mechanisms: the proteasome and autophagy., *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2 (2010) a006734.
- [49] W.E. Balch, R.I. Morimoto, A. Dillin, J.W. Kelly, Adapting proteostasis for disease intervention., *Science.* 319 (2008) 916–919.
- [50] M.S. Hipp, S.-H. Park, F.U. Hartl, Proteostasis impairment in protein-misfolding and -aggregation diseases., *Trends Cell Biol.* 24 (2014) 506–514.
- [51] R.I. Morimoto, A.M. Cuervo, Proteostasis and the aging proteome in health and disease., *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 69 Suppl 1 (2014) S33–S38.
- [52] K. Cuanalo-Contreras, A. Mukherjee, C. Soto, Role of protein misfolding and proteostasis deficiency in protein misfolding diseases and aging., *Int J Cell Biol.* 2013 (2013) 638083.
- [53] E. Wong, A.M. Cuervo, Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases, *Nat. Neurosci.* 13 (2010) 805–811.
- [54] J.-H. Lee, W.H. Yu, A. Kumar, S. Lee, P.S. Mohan, C.M. Peterhoff, D.M. Wolfe, M. Martinez-Vicente, A.C. Massey, G. Sovak, Y. Uchiyama, D. Westaway, A.M. Cuervo, R.A. Nixon, Lysosomal Proteolysis and Autophagy Require Presenilin 1 and Are Disrupted by Alzheimer-Related PS1 Mutations, *Cell.* 141 (2010) 1146–1158.
- [55] R.A. Nixon, D.-S. Yang, J.-H. Lee, Neurodegenerative lysosomal disorders: a continuum from development to late age., *Autophagy.* 4 (2008) 590–599.

- [56] Z. Berger, B. Ravikumar, F.M. Menzies, L.G. Oroz, B.R. Underwood, M.N. Pangalos, I. Schmitt, U. Wullner, B.O. Evert, C.J. O’Kane, D.C. Rubinsztein, Rapamycin alleviates toxicity of different aggregate-prone proteins., *Hum. Mol. Genet.* 15 (2006) 433–442.
- [57] B. Ravikumar, R. Duden, D.C. Rubinsztein, Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy., *Hum. Mol. Genet.* 11 (2002) 1107–1117.
- [58] B. Ravikumar, C. Vacher, Z. Berger, J.E. Davies, S. Luo, L.G. Oroz, F. Scaravilli, D.F. Easton, R. Duden, C.J. O’Kane, D.C. Rubinsztein, Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease., *Nat. Genet.* 36 (2004) 585–595.
- [59] S. Sarkar, J.E. Davies, Z. Huang, A. Tunnacliffe, D.C. Rubinsztein, Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and alpha-synuclein., *J Biol Chem.* 282 (2007) 5641–5652.
- [60] F. Pickford, E. Masliah, M. Britschgi, K. Lucin, R. Narasimhan, P.A. Jaeger, S. Small, B. Spencer, E. Rockenstein, B. Levine, T. Wyss-Coray, The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid beta accumulation in mice., *J. Clin. Invest.* 118 (2008) 2190–2199.
- [61] M.N. Sabbagh, H.A. Shill, Latrepirdine, a potential novel treatment for Alzheimer’s disease and Huntington’s chorea., *Curr. Opin. Investig. Drugs.* 11 (2010) 80–91.
- [62] M. Komatsu, S. Waguri, T. Chiba, S. Murata, J. Iwata, I. Tanida, T. Ueno, M. Koike, Y. Uchiyama, E. Kominami, K. Tanaka, Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice, *Nature.* 441 (2006) 880–884.
- [63] T. Hara, K. Nakamura, M. Matsui, A. Yamamoto, Y. Nakahara, R. Suzuki-Migishima, M. Yokoyama, K. Mishima, I. Saito, H. Okano, N. Mizushima, Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice, *Nature.* 441 (2006) 885–889.
- [64] C.-C. Liang, C. Wang, X. Peng, B. Gan, J.-L. Guan, Neural-specific Deletion of FIP200 Leads to Cerebellar Degeneration Caused by Increased Neuronal Death and Axon Degeneration, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 3499–3509.
- [65] M.L. Tóth, T. Sigmond, E. Borsos, J. Barna, P. Erdélyi, K. Takács-Vellai, L. Orosz, A.L. Kovács, G. Csikós, M. Sass, T. Vellai, Longevity pathways converge on autophagy genes to regulate life span in *Caenorhabditis elegans*., *Autophagy.* 4 (2008) 330–338.
- [66] A. Simonsen, R.C. Cumming, A. Brech, P. Isakson, D.R. Schubert, K.D. Finley, Promoting basal levels of autophagy in the nervous system enhances longevity and oxidant resistance in adult *Drosophila*., *Autophagy.* 4 (2008) 176–184.
- [67] E.J. O’Rourke, P. Kuballa, R. Xavier, G. Ruvkun, ω -6 Polyunsaturated fatty acids extend life span through the activation of autophagy., *Genes Dev.* 27 (2013) 429–440.
- [68] D. Vilchez, I. Saez, A. Dillin, The role of protein clearance mechanisms in organismal ageing and age-related diseases, *Nat. Commun.* 5 (2014) 5659.
- [69] F.J.A. Dennissen, N. Kholod, F.W. van Leeuwen, The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: Culprit, accomplice or victim?, *Prog. Neurobiol.* 96 (2012) 190–207.
- [70] A.N. Hegde, S.C. Upadhyay, Role of ubiquitin–proteasome-mediated proteolysis in nervous system disease, *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 1809 (2011) 128–140.
- [71] K.S.P. McNaught, D.P. Perl, A.-L. Brownell, C.W. Olanow, Systemic exposure to

- proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease., *Ann Neurol.* 56 (2004) 149–162.
- [72] S.R. Yoshii, C. Kishi, N. Ishihara, N. Mizushima, Parkin Mediates Proteasome-dependent Protein Degradation and Rupture of the Outer Mitochondrial Membrane, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 19630–19640.
 - [73] J.W. Um, E. Im, H.J. Lee, B. Min, L. Yoo, J. Yoo, H. Lubbert, C. Stichel-Gunkel, H.-S. Cho, J.B. Yoon, K.C. Chung, Parkin Directly Modulates 26S Proteasome Activity, *J. Neurosci.* 30 (2010) 11805–11814.
 - [74] A. Opattova, P. Filipcik, M. Cente, M. Novak, Intracellular degradation of misfolded tau protein induced by geldanamycin is associated with activation of proteasome., *J. Alzheimers. Dis.* 33 (2013) 339–348.
 - [75] J. Ma, S. Lindquist, Conversion of PrP to a self-perpetuating PrP^{Sc}-like conformation in the cytosol., *Science* (80-.). 298 (2002) 1785–1788.
 - [76] L. Bedford, D. Hay, A. Devoy, S. Paine, D.G. Powe, R. Seth, T. Gray, I. Topham, K. Fone, N. Rezvani, M. Mee, T. Soane, R. Layfield, P.W. Sheppard, T. Ebendal, D. Usoskin, J. Lowe, R.J. Mayer, Depletion of 26S proteasomes in mouse brain neurons causes neurodegeneration and Lewy-like inclusions resembling human pale bodies., *J. Neurosci.* 28 (2008) 8189–8198.
 - [77] L. Gregori, C. Fuchs, M.E. Figueiredo-Pereira, W.E. Van Nostrand, D. Goldgaber, Amyloid beta-protein inhibits ubiquitin-dependent protein degradation in vitro, *J.Biol.Chem.* 270 (1995) 19702–19708.
 - [78] E. Lindersson, R. Beedholm, P. Højrup, T. Moos, W. Gai, K.B. Hendil, P.H. Jensen, Proteasomal inhibition by alpha-synuclein filaments and oligomers., *J Biol Chem.* 279 (2004) 12924–12934.
 - [79] H. Snyder, K. Mensah, C. Theisler, J. Lee, A. Matouschek, B. Wolozin, Aggregated and monomeric alpha-synuclein bind to the S6' proteasomal protein and inhibit proteasomal function., *J Biol Chem.* 278 (2003) 11753–11759.
 - [80] M. Kristiansen, P. Deriziotis, D.E. Dimcheff, G.S. Jackson, H. Ovaa, H. Naumann, A.R. Clarke, F.W.B. van Leeuwen, V. Menéndez-Benito, N.P. Dantuma, J.L. Portis, J. Collinge, S.J. Tabrizi, Disease-associated prion protein oligomers inhibit the 26S proteasome., *Mol Cell.* 26 (2007) 175–188.
 - [81] S. Murata, H. Yashiroda, K. Tanaka, Molecular mechanisms of proteasome assembly., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10 (2009) 104–15.
 - [82] A.F. Kisselev, M. Garcia-Calvo, H.S. Overkleeft, E. Peterson, M.W. Pennington, H.L. Ploegh, N.A. Thornberry, A.L. Goldberg, The caspase-like sites of proteasomes, their substrate specificity, new inhibitors and substrates, and allosteric interactions with the trypsin-like sites., *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 35869–35877.
 - [83] M. Hochstrasser, Origin and function of ubiquitin-like proteins., *Nature.* 458 (2009) 422–429.
 - [84] D. Vilchez, L. Boyer, I. Morante, M. Lutz, C. Merkwirth, D. Joyce, B. Spencer, L. Page, E. Masliah, W.T. Berggren, F.H. Gage, A. Dillin, Increased proteasome activity in human embryonic stem cells is regulated by PSMD11., *Nature.* 489 (2012) 304–308.
 - [85] N. Chondrogianni, M. Sakellari, M. Lefaki, N. Papaevgeniou, E.S. Gonos, Proteasome activation delays aging in vitro and in vivo., *Free Radic. Biol. Med.* 71 (2014) 303–320.
 - [86] U. Tomaru, S. Takahashi, A. Ishizu, Y. Miyatake, A. Gohda, S. Suzuki, A. Ono, J. Ohara, T. Baba, S. Murata, K. Tanaka, M. Kasahara, Decreased proteasomal activity causes age-

- related phenotypes and promotes the development of metabolic abnormalities., *Am. J. Pathol.* 180 (2012) 963–972.
- [87] K.A. Rodriguez, Y.H. Edrey, P. Osmulski, M. Gaczynska, R. Buffenstein, Altered composition of liver proteasome assemblies contributes to enhanced proteasome activity in the exceptionally long-lived naked mole-rat., *PLoS One.* 7 (2012) e35890.
 - [88] I. Dolenc, E. Seemüller, W. Baumeister, Decelerated degradation of short peptides by the 20S proteasome., *FEBS Lett.* 434 (1998) 357–361.
 - [89] M.A. Humbard, J.A. Maupin-Furlow, Prokaryotic proteasomes: nanocompartments of degradation., *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 23 (2013) 321–334.
 - [90] J. Löwe, D. Stock, B. Jap, P. Zwickl, W. Baumeister, R. Huber, Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution., *Science.* 268 (1995) 533–539.
 - [91] T.N. Akopian, A.F. Kisselev, A.L. Goldberg, Processive degradation of proteins and other catalytic properties of the proteasome from *Thermoplasma acidophilum*., *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 1791–1798.
 - [92] P. Venkatraman, R. Wetzel, M. Tanaka, N. Nukina, A.L. Goldberg, Eukaryotic proteasomes cannot digest polyglutamine sequences and release them during degradation of polyglutamine-containing proteins., *Mol. Cell.* 14 (2004) 95–104.
 - [93] S. Yamada, J. Niwa, S. Ishigaki, M. Takahashi, T. Ito, J. Sone, M. Doyu, G. Sobue, Archaeal proteasomes effectively degrade aggregation-prone proteins and reduce cellular toxicities in mammalian cells., *J Biol Chem.* 281 (2006) 23842–23851.
 - [94] J.J. Collins, C. Huang, S. Hughes, K. Kornfeld, The measurement and analysis of age-related changes in *Caenorhabditis elegans*., *WormBook.* (2008) 1–21.
 - [95] D.L. Riddle, T. Blumenthal, B.J. Meyer, J.R. Priess, *The Biological Model*, (1997).
 - [96] V.J. Cristofalo, C. Volker, R.G. Allen, Use of the fibroblast model in the study of cellular senescence., *Methods Mol. Med.* 38 (2000) 23–52.
 - [97] L. Alili, J. Diekmann, M. Giesen, O. Holtkötter, P. Brenneisen, A drug-induced accelerated senescence (DIAS) is a possibility to study aging in time lapse., *Age (Dordr).* 36 (2014) 9658.
 - [98] Life span as a biomarker, (n.d.). <https://www.jax.org/research-and-faculty/research-labs/the-harrison-lab/gerontology/life-span-as-a-biomarker>.
 - [99] L. Harkema, S.A. Youssef, A. de Bruin, Pathology of Mouse Models of Accelerated Aging., *Vet. Pathol.* 53 (2016) 366–389.
 - [100] T. Stiernagle, Maintenance of *C. elegans*, *WormBook.* (2006).
 - [101] J. Jozefczuk, K. Drews, J. Adjaye, Preparation of mouse embryonic fibroblast cells suitable for culturing human embryonic and induced pluripotent stem cells., *J. Vis. Exp.* (2012).
 - [102] R. Faraonio, P. Salerno, F. Passaro, C. Sedia, A. Iaccio, R. Bellelli, T.C. Nappi, M. Comegna, S. Romano, G. Salvatore, M. Santoro, F. Cimino, A set of miRNAs participates in the cellular senescence program in human diploid fibroblasts., *Cell Death Differ.* 19 (2012) 713–721.
 - [103] G.M. Solis, M. Petrascheck, Measuring *Caenorhabditis elegans* life span in 96 well microtiter plates., *J. Vis. Exp.* (2011).
 - [104] G.L. Sutphin, M. Kaeberlein, Measuring *Caenorhabditis elegans* life span on solid media., *J. Vis. Exp.* (2009).
 - [105] S.K. Han, D. Lee, H. Lee, D. Kim, H.G. Son, J.-S. Yang, S.-J. V. Lee, S. Kim, OASIS 2:

- online application for survival analysis 2 with features for the analysis of maximal lifespan and healthspan in aging research, *Oncotarget*. (2016)..
- [106] T. Kawarabayashi, L.H. Younkin, T.C. Saido, M. Shoji, K.H. Ashe, S.G. Younkin, Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid (beta) protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease., *J Neurosci*. 21 (2001) 372–381.
 - [107] R. Khurana, C. Coleman, C. Ionescu-Zanetti, S.A. Carter, V. Krishna, R.K. Grover, R. Roy, S. Singh, Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils, *J. Struct. Biol.* 151 (2005) 229–238.
 - [108] H. Li, F. Rahimi, S. Sinha, P. Maiti, G. Bitan, K. Murakami, Amyloids and Protein Aggregation—Analytical Methods, (n.d.).
 - [109] M. Biancalana, S. Koide, Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils., *Biochim. Biophys. Acta*. 1804 (2010) 1405–1412.
 - [110] M.L. Katz, W.G. Robison, What is lipofuscin? Defining characteristics and differentiation from other autofluorescent lysosomal storage bodies, *Arch. Gerontol. Geriatr.* 34 (2002) 169–184.
 - [111] J.R. Sparrow, Y. Wu, T. Nagasaki, K.D. Yoon, K. Yamamoto, J. Zhou, Fundus autofluorescence and the bisretinoids of retina., *Photochem. Photobiol. Sci.* 9 (2010) 1480–1489.
 - [112] H.C. Ishikawa-Ankerhold, R. Ankerhold, G.P.C. Drummen, Advanced Fluorescence Microscopy Techniques—FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM, *Molecules*. 17 (2012) 4047–4132.
 - [113] H. LeVine, Quantification of beta-sheet amyloid fibril structures with thioflavin T., *Methods Enzymol.* 309 (1999) 274–284.
 - [114] M. Malisauskas, C. Weise, K. Yanamandra, M. Wolf-Watz, L. Morozova-Roche, Lability Landscape and Protease Resistance of Human Insulin Amyloid: A New Insight into Its Molecular Properties, *J. Mol. Biol.* 396 (2010) 60–74.
 - [115] F. Sarsoza, T. Saing, R. Kaye, R. Dahlin, M. Dick, C. Broadwater-Hollifield, S. Mobley, I. Lott, E. Doran, D. Gillen, C. Anderson-Bergman, D.H. Cribbs, C. Glabe, E. Head, A fibril-specific, conformation-dependent antibody recognizes a subset of Abeta plaques in Alzheimer disease, Down syndrome and Tg2576 transgenic mouse brain., *Acta Neuropathol.* 118 (2009) 505–517.
 - [116] R. Kaye, E. Head, F. Sarsoza, T. Saing, C.W. Cotman, M. Necula, L. Margol, J. Wu, L. Breydo, J.L. Thompson, S. Rasool, T. Gurlo, P. Butler, C.G. Glabe, Fibril specific, conformation dependent antibodies recognize a generic epitope common to amyloid fibrils and fibrillar oligomers that is absent in prefibrillar oligomers., *Mol. Neurodegener.* 2 (2007) 18.
 - [117] R.R. Kopito, Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation, *Trends Cell Biol.* 10 (2000) 524–530.
 - [118] B.Y. Feng, B.H. Toyama, H. Wille, D.W. Colby, S.R. Collins, B.C.H. May, S.B. Prusiner, J. Weissman, B.K. Shoichet, Small-molecule aggregates inhibit amyloid polymerization., *Nat Chem Biol.* 4 (2008) 197–199.
 - [119] M. Verma, A. Sharma, S. Naidu, A.K. Bhadra, R. Kukreti, V. Taneja, Curcumin prevents formation of polyglutamine aggregates by inhibiting Vps36, a component of the ESCRT-II complex., *PLoS One*. 7 (2012) e42923.
 - [120] S. Gautam, S. Karmakar, A. Bose, P.K. Chowdhury, β -cyclodextrin and curcumin, a potent cocktail for disaggregating and/or inhibiting amyloids: a case study with α -

- synuclein., *Biochemistry*. 53 (2014) 4081–4083.
- [121] T. Miyasaka, C. Xie, S. Yoshimura, Y. Shinzaki, S. Yoshina, E. Kage-Nakadai, S. Mitani, Y. Ihara, Curcumin improves tau-induced neuronal dysfunction of nematodes., *Neurobiol Aging*. 39 (2016) 69–81.
 - [122] Z. Pincus, F.J. Slack, Developmental biomarkers of aging in *Caenorhabditis elegans*., *Dev. Dyn*. 239 (2010) 1306–1314.
 - [123] D. Raizen, B.-M. Song, N. Trojanowski, Y.-J. You, Methods for measuring pharyngeal behaviors*, (2012).
 - [124] A. Bansal, L.J. Zhu, K. Yen, H.A. Tissenbaum, Uncoupling lifespan and healthspan in *Caenorhabditis elegans* longevity mutants, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112 (2015) E277–E286.
 - [125] J. Labbadia, R.I. Morimoto, The biology of proteostasis in aging and disease., *Annu Rev Biochem.* 84 (2015) 435–464.
 - [126] L. Goldschmidt, P.K. Teng, R. Riek, D. Eisenberg, Identifying the amyloids, proteins capable of forming amyloid-like fibrils., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 3487–3492.
 - [127] C. Soto, L. Estrada, J. Castilla, Amyloids, prions and the inherent infectious nature of misfolded protein aggregates., *Trends Biochem. Sci.* 31 (2006) 150–155.
 - [128] K. Dasuri, A. Nguyen, L. Zhang, O.S. Fernandez-Kim, A.J. Bruce-Keller, B.A. Blalock, R. De Cabo, J.N. Keller, Comparison of rat liver and brain proteasomes for oxidative stress-induced inactivation: Influence of ageing and dietary restriction, *Free Radic. Res.* 43 (2009) 28–36.
 - [129] E.R. Einstein, Physiological basis of aging and geriatrics. Paola S. Timiras, New York: MacMillan. 1988, 467 pp., *J. Neurosci. Res.* 23 (1989) 476–476.
 - [130] N. Raz, K.M. Rodrigue, Differential aging of the brain: Patterns, cognitive correlates and modifiers, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 30 (2006) 730–748.
 - [131] L. Harkema, S.A. Youssef, A. de Bruin, Pathology of Mouse Models of Accelerated Aging, *Vet. Pathol.* 53 (2016) 366–389.
 - [132] M. Wiersma, R.H. Henning, B.J.J.M. Brundel, Derailed Proteostasis as a Determinant of Cardiac Aging, *Can. J. Cardiol.* 32 (2016) 1166.e11–1166.e20.
 - [133] A. Terman, T. Kurz, M. Navratil, E.A. Arriaga, U.T. Brunk, Mitochondrial turnover and aging of long-lived postmitotic cells: the mitochondrial-lysosomal axis theory of aging., *Antioxid Redox Signal.* 12 (2010) 503–535.
 - [134] F. Rodier, J. Campisi, Four faces of cellular senescence, *J. Cell Biol.* 192 (2011).
 - [135] Y. Zhu, J.L. Armstrong, T. Tchkonja, J.L. Kirkland, Cellular senescence and the senescent secretory phenotype in age-related chronic diseases, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 17 (2014) 324–328.
 - [136] K.F. Winklhofer, J. Tatzelt, C. Haass, The two faces of protein misfolding: gain- and loss-of-function in neurodegenerative diseases., *EMBO J.* 27 (2008) 336–349.
 - [137] P. Westermark, Aspects on human amyloid forms and their fibril polypeptides., *FEBS J.* 272 (2005) 5942–5949.
 - [138] K. Lundmark, G.T. Westermark, A. Olsén, P. Westermark, Protein fibrils in nature can enhance amyloid protein A amyloidosis in mice: Cross-seeding as a disease mechanism., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 6098–6102.
 - [139] R. Kaye, C.A. Lasagna-Reeves, Molecular mechanisms of amyloid oligomers toxicity., *J. Alzheimers. Dis.* 33 Suppl 1 (2013) S67–78.
 - [140] B.P. Tseng, K.N. Green, J.L. Chan, M. Blurton-Jones, F.M. LaFerla, Abeta inhibits the

- proteasome and enhances amyloid and tau accumulation., *Neurobiol Aging*. 29 (2008) 1607–1618.
- [141] J. Guan, S. Mishra, Y. Qiu, J. Shi, K. Trudeau, G. Las, M. Liesa, O.S. Shirihai, L.H. Connors, D.C. Seldin, R.H. Falk, C.A. MacRae, R. Liao, Lysosomal dysfunction and impaired autophagy underlie the pathogenesis of amyloidogenic light chain-mediated cardiotoxicity., *EMBO Mol. Med*. 6 (2014) 1493–1507.
 - [142] M.F. Knauer, B. Soreghan, D. Burdick, J. Kosmoski, C.G. Glabe, Intracellular accumulation and resistance to degradation of the Alzheimer amyloid A4/beta protein, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 89 (1992) 7437–7441.
 - [143] L.R.C.B. and, M.R. Vinqvist, Kazuo Mukai, Hideo Goto, Yoshimi Hashimoto, and Aiko Tokunaga, H. Uno, On the Antioxidant Mechanism of Curcumin: Classical Methods Are Needed To Determine Antioxidant Mechanism and Activity, (2000).
 - [144] S.-J. Wang, Y. Tong, S. Lu, R. Yang, X. Liao, Y.-F. Xu, X. Li, Anti-inflammatory activity of myricetin isolated from *Myrica rubra* Sieb. et Zucc. leaves., *Planta Med*. 76 (2010) 1492–1496.
 - [145] S. Turnbull, B.J. Tabner, D.R. Brown, D. Allsop, Quinacrine acts as an antioxidant and reduces the toxicity of the prion peptide PrP106-126., *Neuroreport*. 14 (2003) 1743–1745.
 - [146] H.R. Brignull, F.E. Moore, S.J. Tang, R.I. Morimoto, Polyglutamine Proteins at the Pathogenic Threshold Display Neuron-Specific Aggregation in a Pan-Neuronal *Caenorhabditis elegans* Model, *J. Neurosci*. 26 (2006) 7597–7606.
 - [147] D. CHOW, C. GLENN, J. JOHNSTON, I. GOLDBERG, C. WOLKOW, Sarcopenia in the *Caenorhabditis elegans* pharynx correlates with muscle contraction rate over lifespan, *Exp. Gerontol*. 41 (2006) 252–260.
 - [148] S. Kaushik, A.M. Cuervo, Proteostasis and aging, *Nat. Med*. 21 (2015) 1406–1415.
 - [149] H. Ohtsuka, K. Azuma, H. Murakami, H. Aiba, hsf1 (+) extends chronological lifespan through Ecl1 family genes in fission yeast., *Mol. Genet. Genomics*. 285 (2011) 67–77.
 - [150] J.F. Morley, R.I. Morimoto, Regulation of longevity in *Caenorhabditis elegans* by heat shock factor and molecular chaperones., *Mol. Biol. Cell*. 15 (2004) 657–664.
 - [151] C. Zabel, H.P. Nguyen, S.C. Hin, D. Hartl, L. Mao, J. Klose, Proteasome and oxidative phosphorylation changes may explain why aging is a risk factor for neurodegenerative disorders., *J. Proteomics*. 73 (2010) 2230–2238.
 - [152] N. Wittenburg, R. Baumeister, Thermal avoidance in *Caenorhabditis elegans*: an approach to the study of nociception., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 10477–10482.
 - [153] S. Morita, T. Tsujinaka, M. Yano, C. Ebisui, T. Morimoto, J. Fujita, A. Ogawa, M. Taniguchi, H. Shiozaki, M. Monden, Temperature-Dependent Enhancement of Proteolysis in C2C12 Myotubes in Association with the Activation of 26S Proteasome, *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 228 (1996) 813–818.
 - [154] N.D. Trinklein, W.C. Chen, R.E. Kingston, R.M. Myers, Transcriptional regulation and binding of heat shock factor 1 and heat shock factor 2 to 32 human heat shock genes during thermal stress and differentiation., *Cell Stress Chaperones*. 9 (2004) 21–28.
 - [155] B.A. Buckley, G.E. Hofmann, Thermal acclimation changes DNA-binding activity of heat shock factor 1 (HSF1) in the goby *Gillichthys mirabilis*: implications for plasticity in the heat-shock response in natural populations., *J. Exp. Biol*. 205 (2002) 3231–3240.
 - [156] T. Grune, B. Catalgol, A. Licht, G. Ermak, A.M. Pickering, J.K. Ngo, K.J.A. Davies, HSP70 mediates dissociation and reassociation of the 26S proteasome during adaptation to oxidative stress, *Free Radic. Biol. Med*. 51 (2011) 1355–1364.

- [157] S. Reeg, T. Jung, J.P. Castro, K.J.A. Davies, A. Henze, T. Grune, The molecular chaperone Hsp70 promotes the proteolytic removal of oxidatively damaged proteins by the proteasome, *Free Radic. Biol. Med.* 99 (2016) 153–166.

Apéndice I. Preparación de soluciones

Medio NGM (2.5 l)

- 7.5 g NaCl
- 42.5 g agar
- 18.75 g peptona

Medio NGM (2.5 l)

- 7.5 g NaCl
- 42.5 g agar
- 18.75 g peptona
- 2.5 l dH₂O

Esterilizar a 121 °C por 45 min en una autoclave, enfriar y agregar:

- 62.5 ml buffer de fosfatos (K₂HPO₄/KH₂PO₄)
- 2.5 ml CaCl₂ (1 M)
- 2.5 ml colesterol (5 mg/ml)
- 2.5 ml MgSO₄ (1 M)
- 250 µl estreptomicina (250 mg/ml)

Solución de lisis (1.5 ml)

- 0.5 ml NaOH (5 N)
- 1 ml NaClO (5%)

Solución amortiguadora M9 (1 l)

- 3 g KH_2PO_4
- 6 g Na_2HPO_4
- 0.5 g NaCl
- 1 g NH_4Cl
- 1 l dH_2O

Medio S

- 5.85 g NaCl
- 1 g K_2HPO_4
- 6 g KH_2PO_4
- 1 ml colesterol (5 mg/ml)
- 1 l dH_2O

Esterilizar a 121 °C por 45 min en una autoclave, enfriar y agregar:

- 10 ml citrato de potasio (1 M, pH 6)
- 10 ml solución de metales traza
- 3 ml CaCl_2 (1 M)
- 3 ml MgSO_4 (1 M)

Medio de cultivo para FEMs (500 ml)

- 450 ml medio mínimo esencial de Eagle modificado por Dubbeco (DMEM, Sigma)
- 50 ml suero fetal bovino (Gibco)
- 5 ml aminoácidos no esenciales (100x, Gibco)
- 5 ml antimicótico-antibiótico (100x, Gibco)

Formaldehído 4% (100 ml)

- 4 g paraformaldehído
- 90 ml dH₂O

Disolver con calentamiento y añadir unas gotas de solución alcalina de NaOH, una vez disuelto agregar 10 ml de PBS 10X.

5-bromodeoxiuridina (10 mM)

- 100 mg 5-Bromodeoxiuridina
- 32.5 ml de medio mínimo esencial de Eagle modificado por Dubbeco (DMEM, Sigma)

Solución TCT

Tris-HCl 50mM (1 litro, 10X)

- 15g Na₂HPO₄ X 2H₂O
- 4.8g KH₂PO₄
- 70g NaCl
- 50g Tris base
- 2g NaN₃

Ajustar pH a 7.8 con NaOH or HCl

TCT

- 0.7% λ-carragenina
- 0.5% Triton X-100

Preparar la solución en Tris-HCl 1X

Amortiguador acuoso (200 ml)

- 0.4844 g TRIS Base
- 1.1688 g NaCl

Ajustar a un pH 7.4

Amortiguador con detergente (200 ml)

- 2 ml dodecilsulfato sódico 10%
- 2 g desoxicolato de sodio
- 2 ml Igepal

Disolver en 200 ml de amortiguador acuoso

Solución para tinción de Coomassie

- Azul brillante 0.1%
- Metanol 50%
- H₂O 40%
- Ácido acético glacial 10%

Solución para desteñir Coomassie

- Metanol 50%
- H₂O 40%
- Ácido acético glacial 10%

Amortiguador para anticuerpos

- 1X PBS
- 0.5% Triton X-100

- 1 mM EDTA
- 0.1% albúmina de suero bovino
- 0.05% azida de sodio

TBST 10X 4 l

- 352 g NaCl
- 96.8 g TRIS
- 4 l dH₂O

Ajustar pH a 7.6 con HCl

Diluir 1:10 para su uso y agregar 0.1% Tween 20

Amortiguador para preservar la actividad proteasomal

- 25 mM Tris-HCl (pH 7.5)
- 0.25 M sucrosa
- 1 mM EDTA
- 1 mM DTT



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

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



Delaying aging in *Caenorhabditis elegans* with protein aggregation inhibitors

Karina Cuanalo-Contreras^{a, b}, Kyung-Won Park^a, Abhisek Mukherjee^a,
Lourdes Millán-Pérez Peña^b, Claudio Soto^{a, *}

^a Mitchell Center for Alzheimer's Disease and Related Brain Disorders, Department of Neurology, University of Texas Houston Medical School, 6431 Fannin St, Houston, TX 77030, USA

^b Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, Centro de Química, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Pue, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:
Received 4 October 2016
Accepted 29 October 2016
Available online xxx

Keywords:
Aging
Protein misfolding
C. elegans
Aggregation inhibitors
Lifespan

ABSTRACT

Recent evidence suggests that during aging there is widespread accumulation of aggregated insoluble proteins, even in the absence of pathological conditions. Pharmacological manipulation of protein aggregation might be helpful to unveil the involvement of protein aggregates during aging, as well as to develop novel strategies to delay aging. Here we investigated the effect of known protein aggregation inhibitors on the lifespan and health-span of *Caenorhabditis elegans*. For this purpose, we selected various structurally diverse anti-aggregation compounds and screened them in liquid and solid medium for their ability to alter the rate of aging *in vivo*. Our results show that treatment of *C. elegans* with diverse aggregation inhibitors significantly increases the animal lifespan and health-span. These findings indicate that protein misfolding and aggregation may play an important role in cellular dysfunction during aging, opening a novel approach to increase longevity and enhance the quality of life during aging.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Aging can be defined as a progressive loss of function that increases vulnerability to environmental factors and augments the risk of disease and death. It is crucial to better understand the mechanisms implicated in cellular dysfunction during aging because the elderly population is substantially growing. By 2050, the population over 65 years old is expected to reach more than 83 million in the United States and is estimated to be 2.5 times more than the population of ages 0 to 4 worldwide [1]. As people age, there is an elevated risk of developing certain pathological conditions that impact the quality of life, which is accompanied by increased medical care expenses. Several mechanisms have been proposed to be responsible for aging, including accumulation of damaged proteins, telomere-shortening, oxidative damage, somatic mutations, mitochondrial damage and epigenetic changes [2–8]. The age-related accumulation of altered proteins is of particular interest because of the well-established contribution of

specific protein aggregates in age-related protein misfolding disorders, such as Parkinson's disease and Alzheimer's disease [9,10]. Protein aggregation during the aging process remains largely uncharacterized, despite evidence suggesting an inverse correlation with longevity. Multiple *in vivo* models, such as *Caenorhabditis elegans* and *Saccharomyces cerevisiae*, exhibit an age-dependent and widespread accumulation of different insoluble proteins [11–13]. Indeed, a previous study in the worm showed that more than 400 different proteins consistently become insoluble during aging [11]. Moreover, various studies have shown that lifespan and healthspan can be increased by reducing protein aggregates via modulation of protein clearance pathways (*i.e.* autophagy, proteasome) [14–21]. Furthermore, the recent quest for small compounds to enhance longevity revealed several molecules with a dual effect that increases lifespan and reduces protein aggregation [22–24], including established amyloid binding compounds [22,25]. Collectively this data emphasizes the potential for targeting protein aggregation for the purpose of extending longevity and improving the health of our aged population.

Various aggregation inhibitors have been reported for amyloid-beta, tau, α -synuclein and the prion protein [26–32]. In the present study, a group of known and structurally diverse protein

* Corresponding author.
E-mail address: Claudio.Soto@uth.tmc.edu (C. Soto).

aggregation inhibitors, which have been reported to target different disease-associated proteins, were investigated for their effect on lifespan and healthspan of *C. elegans*. We first performed a liquid medium screening to determine which compounds extended survival before scoring lifespan and healthspan in a solid medium assay. Overall, our results show that the administration of aggregation inhibitors significantly delayed the aging process *in vivo*.

2. Material and methods

2.1. Nematode culture

The wild type N2 *Caenorhabditis elegans* strain and the streptomycin resistant/uracil auxotroph *Escherichia coli* OP50 were purchased from *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC), University of Minnesota (<http://www.cbs.umn.edu/CGC/>).

For liquid medium culture, bleaching solution, M9 buffer, S-complete solution and live OP50 *E. coli* were prepared following a previously reported protocol [33]. To establish an age-synchronized population, N2 eggs were isolated from gravid adults using bleaching solution. Once adults were dissolved, eggs were washed in M9 buffer and allowed to hatch overnight in S-complete solution. The concentration of hatched worms was adjusted to 100 worms per ml with S-complete containing 25 µg/ml streptomycin and 6 mg/ml live *E. coli* OP50. Clear bottom 96 well plates were seeded with 120 µl of worm solution per well and incubated at 20 °C. FUDR sterilization (120 µM, final concentration) was performed when nematodes reached L4 stage.

Solid medium culture was performed following a slightly modified version of a previously described procedure [34]. Briefly, day 1 N2 hermaphrodite adult worms were allowed a 2 h Time Egg Laying (TEL) period in FUDR free/Streptomycin (25 µg/ml)/Nematode Growth Medium (NGM) plates containing live *E. coli* OP50. After the TEL period, all adult hermaphrodites were eliminated, leaving only the eggs in the plate at 20 °C until they hatched. Once the L4 stage was reached, 25 worms were transferred to Streptomycin/NGM plates (60 mm) containing 50 µM FUDR and alive *E. coli* OP50, then incubated at 20 °C.

2.2. Screening anti-aggregation compounds in liquid medium

The following anti-aggregation compounds were passed through a 20 µm filter and administered on the first day of adult life at the indicated concentrations: myricetin (Sigma-Aldrich), quinacrine mustard (Santa Cruz Biotechnology), lacmoid (Sigma-Aldrich), rhodanine (Sigma-Aldrich), chorazole black (Sigma-Aldrich), 8-Anilino-1-naphthalenesulfonic acid (ANSA) (Sigma-Aldrich) and curcumin (Sigma-Aldrich). Experiments were performed in parallel with the appropriate control groups, which received the same volume of solvent used in the treatment groups (Table 1). Live *E. coli* OP50 (500 µg) was added every 5 days to prevent starvation. Plate sealing was periodically removed to allow oxygenation. For lifespan studies, an average of 30 worms were

scored per condition using a Leica DMI6000 B inverted microscope. Worms that showed no movement upon observation were scored as dead.

2.3. Analysis of lifespan and healthspan in solid medium

Pre-filtered solutions of myricetin (120 µM, final concentration), quinacrine mustard (7.5 µM, final concentration), ANSA (120 µM, final concentration) and curcumin (100 µM, final concentration) were added to autoclaved NGM medium before solidification. Petri dishes were stored in complete darkness at 4 °C until their use. In parallel, control groups received the same volume of solvent as the treatment groups. For the first day of adult life, nematodes were exposed to the compounds and manually transferred to fresh plates every other day. Lifespan was monitored with a Leica MZ16F Stereomicroscope. Worms were scored as dead when unresponsive to head tapping with a platinum wire. Worms that fled (crawl out or in the media) were censored for the analysis.

For healthspan studies, a Leica MZ16F Stereomicroscope was used to determine the pharynx pumping rate for 30 worms per group by counting the number of contractions in a 30 s interval.

2.4. Statistical analysis

Kaplan-Meier analysis was used to create the survival curves and the log-rank test to determine significance. T-tests were also performed using GraphPad Prism 5.02 to analyze the healthspan data. Survival analysis were done using the platform OASIS2 (Online Application for Survival Analysis 2) [35]. Mean survival was calculated as the average adult life lifespan. Median survival was calculated as the time fractional survival equaled 50%. Maximal survival represents the time fractional survival equaled 10%.

3. Results

3.1. Identification of anti-aggregation compounds that extend the median survival of *C. elegans*

Myricetin, quinacrine mustard, lacmoid, rhodanine, chlorazole black, ANSA and curcumin were selected after performing an exhaustive literature revision to identify previously reported inhibitors with “wide spectrum” anti-aggregation activities that exemplify sequence independent binding [26–32]. Compounds selected are substantially structurally diverse (Fig. 1), which is important to minimize the possibility that the effect observed might be dependent on other common properties, such as for example an anti-oxidant activity.

To screen these aggregation inhibitors for an effect on aging, *C. elegans* was chosen as the model organism because they are small and transparent with a short lifespan, which opens the possibility to perform screenings in microliter plates [33]. Moreover, *C. elegans* is an appropriate model because a majority of their cells are post mitotic, facilitating the study of the accumulation of damaged

Table 1
Summary of liquid medium screening. All compounds were tested at 7.5, 15, 30, 60, 120 and 240 µM (n = 30 worms per experiment). Columns 4 contains median survival in respect to the appropriate control.

Compound	Group	Control	Effect on median survival (% of control)
Myricetin	Polyphenol	0.6% DMSO	27% increase at various concentrations
Quinacrine	Phenothiazine	H ₂ O	23% increase at 7.5 µM
ANSA	Organosulfur	0.4% DMF	15% increase at 60 µM
Chorazole black	Sulfonated dye	H ₂ O	31% increase at 7.5 µM
Rhodanine	Thiazolidine	H ₂ O	8% increase at 7.5 µM
Lacmoid	Phenothiazine	0.78% EtOH	6% decrease at various concentrations

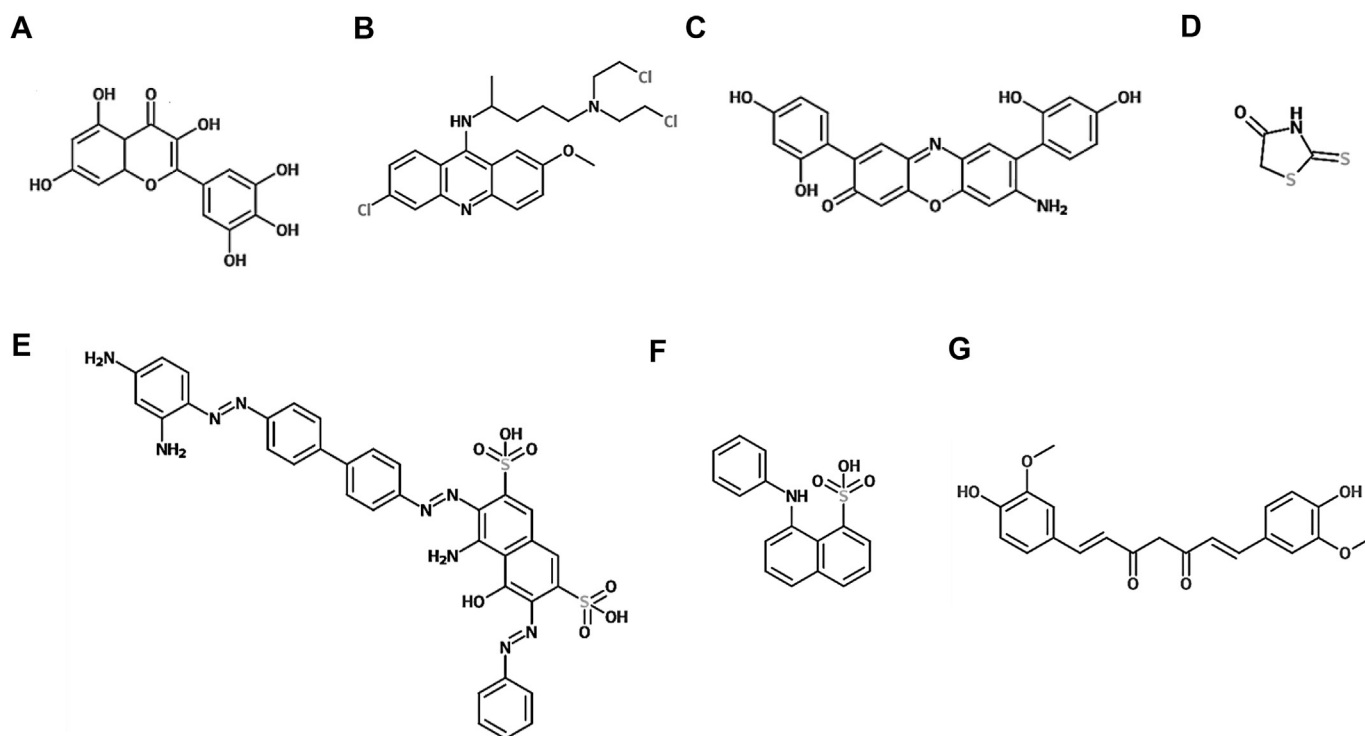


Fig. 1. Structure of the aggregation inhibitors. A) Myricetin, B) Quinacrine mustard, C) Lacmoid, D) Rhodanine, E) Chorazole black, F) ANSA and G) Curcumin.

biomolecules during aging. Finally, as stated above, it has been reported that aged worms accumulate large amounts of many insoluble proteins [11].

FUDR sterilized *C. elegans* were grown for their entire lifespan in liquid medium containing the anti-aggregation compounds (Table 1). Myricetin, quinacrine mustard, lacmoid, rhodanine, chlorazole black, and ANSA were screened at final concentrations of 7.5, 15, 30, 60, 120 and 240 μ M. We observed an increase in the median survival for nematodes treated with all concentrations of myricetin (27%, from 10 days to 14 days), 7.5 μ M quinacrine (23%, from 13 days to 16 days) and 60 μ M ANSA (15%, from 13 days to 15 days). In addition, the lowest concentration (7.5 μ M) of chorazole black tested was discovered to exert a 31% (from 13 days to 17 days) increase in median survival, however higher concentrations were toxic and reduced the median survival. Similarly, rhodanine reduced lifespan at most concentrations tested, except for a small increase at the lowest dose tested (8% at 7.5 μ M). A similar toxic effect was observed for lacmoid, where all the concentrations tested reduced the survival. In summary, treatment with 4 out of 6 anti-aggregation compounds increased the median survival of *C. elegans*.

3.2. Lifespan studies in solid medium

Myricetin, quinacrine mustard, ANSA and curcumin were selected to be studied more in detail in solid medium. Although curcumin was tested in liquid medium the results cannot be interpreted because the compound precipitated in S-medium. Nevertheless, given the extensive previous reports indicating that curcumin is an efficient inhibitor of the aggregation of diverse proteins, we included this compound for our studies in solid medium.

Administration of all these compounds significantly increased mean and maximal survival in the solid medium based assay compared with the appropriate control (Fig. 2). 7.5 μ M quinacrine

extended mean and maximal survival by 18.30% (from 13.11 days to 15.51 days) and 11.76% (from 17 days to 19 days), respectively. 120 μ M myricetin produced a 34.33% increase in mean survival (from 14.01 days to 18.82 days) and a 33.33% elongation of maximal survival (from 18 days to 24 days). 100 μ M Curcumin caused a 12.62% extension in mean survival (from 15.44 days to 17.39 days) and an increase of 27.77% in maximal survival (from 18 days to 23 days). Although smaller changes were observed for 120 μ M ANSA, which produced a 22.71% extension in mean survival (from 11.4 days to 13.99 days) and 15.38% maximal survival (from 13 days to 15 days), the effects were still highly significant compared to the controls.

3.3. Lifespan extension is coupled with healthspan benefits

Extensive work has been done to characterize measurable biomarkers of aging in *C. elegans* [36]. The pharynx pumping rate is among the most accepted and readily used indicators for healthspan because it is well documented that pumping rate decreases with aging and is correlated with age-related muscular degeneration [36,37]. To assess if the treatment with the selected inhibitors of aggregation caused a healthspan benefit, we utilized the solid medium based assay to measure the age-associated changes in the pharyngeal pumping rate on days 2, 4, 6 and 8 post-treatment (Fig. 3). The duration of this experiment was chosen because previous reports indicate that little or no pharyngeal pumping can be observed after day 12 of adulthood. Treatment with all the 4 selected protein aggregation inhibitors produced a highly significant increase on pharyngeal pumping rate at all times analyzed, suggesting that the lifespan extension observed was coupled with a benefit on healthspan.

4. Discussion

Proteins are essential biomolecules that perform a variety of

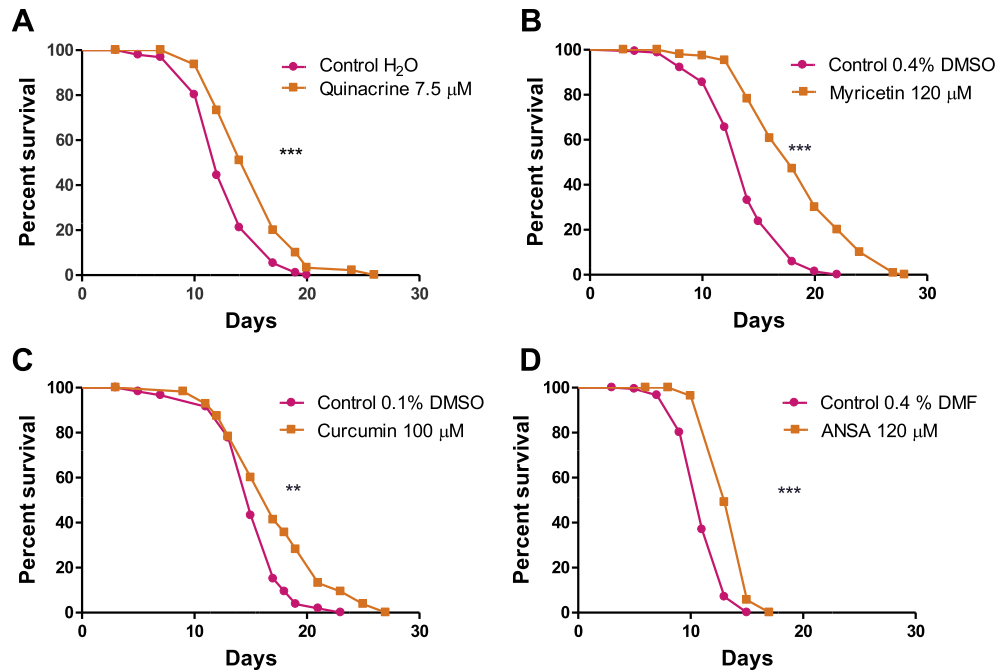


Fig. 2. Anti-aggregation compounds prolong lifespan of *C. elegans*. Survival curves of worms treated in solid medium with A) 7.5 μ M quinacrine mustard ($n = 99$), B) 120 μ M myricetin ($n = 160$), C) 100 μ M curcumin ($n = 60$) and D) 120 μ M ANSA ($n = 117$). Survival analysis was done with respect to the appropriate control and the log-rank test was used to make comparisons. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

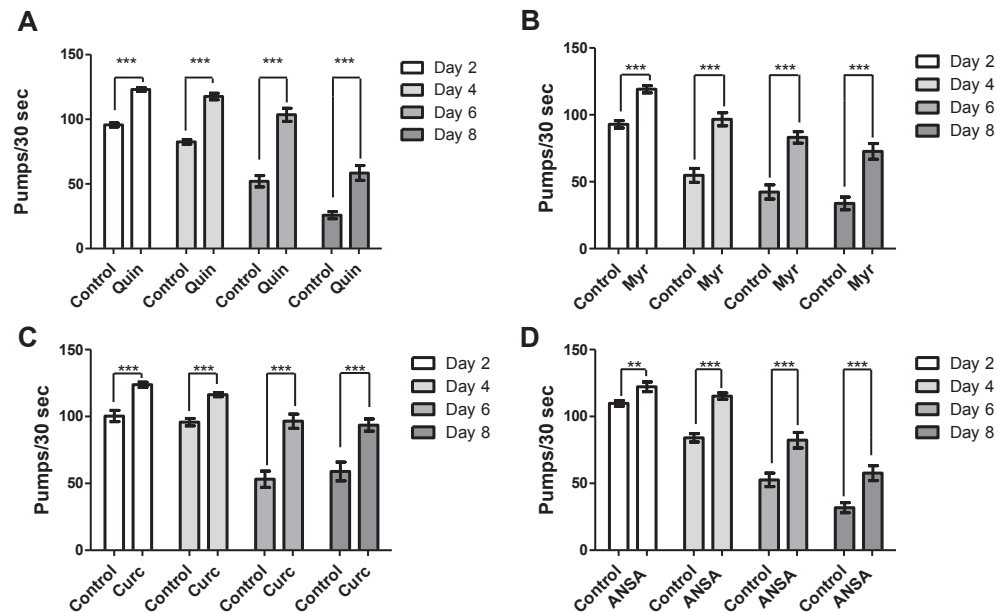


Fig. 3. Healthspan of *C. elegans* improved by treatment with anti-aggregation compounds. Pharynx pumping rate for treated worms on days 2, 4, 6 and 8 post-treatment ($n = 30$). A) 7.5 μ M quinacrine mustard, B) 120 μ M myricetin, C) 100 μ M curcumin and D) 120 μ M ANSA. P values (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) were determined by the T-test.

functions to sustain life. To remain biologically active, they must maintain the proper conformation and solubility. For this reason, protein folding is preserved through a delicate balance that is carefully maintained by various essential and highly conserved protein quality control pathways. If proteostasis is disrupted, proteins may aberrantly fold, aggregate and accumulate, which results in cellular damage and dysfunction. Although multiple factors influence the complex process of aging, the general collapse in

proteostasis that occurs over the course of the lifespan is thought to play an important role in aging [38]. In the present study, we demonstrated that the *in vivo* treatment of *C. elegans* with anti-aggregation compounds successfully modified the rate of aging producing a significant effect on lifespan and healthspan.

Myricetin, quinacrine mustard, lacmoid, rhodanine, chlorazole black, ANSA and curcumin were chosen for this study because they all share the ability to bind and inhibit aggregation of different

proteins implicated in various age-related protein misfolding diseases. The precise mechanism of action of these compounds is still unknown, however cell-free assays and molecular dynamics studies suggest that they directly recognize specific aggregate conformations, rather than a particular amino acid sequence [28–31,39,40]. These features make them desirable to screen for their effect on aging, where many proteins are undergoing aggregation. For instance, myricetin [26,30,31,41], quinacrine [31], curcumin [31,42,43] and lacmoid have been described as inhibitors of A β and tau aggregation. Disruption of α -synuclein and tau aggregates can be achieved by the use of chlorazole black [29] and rhodanine [26,44], respectively. Quinacrine also inhibits the generation of misfolded and infectious prion protein [32] and has been tested in human clinical trials for the treatment of Creutzfeldt-Jakob disease. Although there are not studies showing that ANSA can act as inhibitor of protein aggregation, it has been reported to bind hydrophobic patches of prefibrillar oligomeric species of A β [45] and has been widely used as a fluorescent probe to identify conformational changes in proteins [46].

These anti-aggregation compounds extended mean survival of *C. elegans* in the range of 12%–34% and maximal survival in the range of 11%–33%. Although the precise mechanism for this beneficial effect against aging is unclear, the only common activity among these compounds is their ability to prevent protein aggregation and thus we hypothesize that their anti-aging effect is dependent on inhibiting protein misfolding and aggregation. Inhibition might be through a direct interaction leading to various possible pathways, including prevention of aggregate formation, blockage of aggregation intermediates, disruption of mature aggregates or stimulation of protein re-folding. Aside from a direct interaction, we cannot rule out other possible molecular mechanisms in which the compounds may affect elements of the autophagy, the proteasome or the endogenous chaperone system. Furthermore, some of the compounds tested have been described as anti-oxidants or anti-inflammatory agents [47–49], which may also contribute to slowing down the aging process. Hence, further efforts should be done to characterize the *in vivo* mechanism of action and to determine if their lifespan and healthspan enhancing activities are indeed caused by a direct effect on protein aggregation. In order to provide deeper mechanistic insight, it will be interesting to assess the effect of these anti-aggregation compounds in certain *C. elegans* mutants, such as the one expressing fluorescently tagged aggregation-prone polyQ proteins [50]. Since the molecular pathways responsible for aging are likely conserved between invertebrates and higher organisms [51], it would be important to study the anti-aging effect of these compounds in more relevant, larger animal models in mammals.

Our study exemplifies that lifespan can be extended simultaneously with improving the healthspan. The pharynx in *C. elegans* is known to exhibit functional decline and reduced contraction with aging, which has been described as an effect of progressive sarcopenia [52]. Here, we show that nematodes exposed to the anti-aggregation compounds exhibited a delayed decline in pharyngeal pumping, suggesting an improved healthspan. A possible explanation is that the compounds inhibit protein aggregation in muscular tissue, making it less prone to functional decline from the sequestration of proteins into aggregates. Taken together, adult lifelong treatment with aggregation inhibitors, allows worms to live longer and healthier.

The detailed characterization of the role of age-related protein aggregation in different models and tissues and the understanding of the mechanism of action of the tested compounds will be fundamental for the development of improved inhibitors that may prevent or delay aging. Nowadays there are several useful tools to perform that task, including the use of combinatory libraries,

structure-activity relationship studies or generation of pharmacophore models to perform screenings. This study, might serve as scaffold to further design modifiers of the rate of aging.

In conclusion, our results support previous findings indicating that protein aggregation plays a key role in aging. Therefore, pharmacological interventions to inhibit protein aggregation could be an interesting therapeutic approach to ameliorate or prevent the age-related phenotype and extend lifespan, as well as to guide the development of newer and more efficient anti-aging therapies.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest in this work.

Acknowledgements

K.C.C. was supported with a Scholarship 230292/353186 from CONACyT and Posgrado en Ciencias Químicas, BUAP.

References

- [1] B.J.M. Ortman, V. Velkoff, H. Hogan, An Aging Nation: the Older Population in the United States vol. 1964, Econ. Stat. Adm. US Dep. Commer, 2014, pp. 1–28.
- [2] A.R. Hipkiss, Accumulation of altered proteins and ageing: causes and effects, *Exp. Gerontol.* 41 (2006) 464–473.
- [3] R.S. Sohal, Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process, *Free Radic. Biol. Med.* 33 (2002) 37–44.
- [4] D. Knoefler, M. Thamsen, M. Konieczek, N.J. Niemuth, A.-K. Diederich, U. Jakob, Quantitative *in vivo* redox sensors uncover oxidative stress as an early event in life, *Mol. Cell.* 47 (2012) 767–776.
- [5] T.B.L. Kirkwood, Understanding the odd science of aging, *Cell* 120 (2005) 437–447.
- [6] D. Yin, K. Chen, The essential mechanisms of aging: irreparable damage accumulation of biochemical side-reactions, *Exp. Gerontol.* 40 (2005) 455–465.
- [7] S. Ostojic, N. Perez, M. Kapovic, A current genetic and epigenetic view on human aging mechanisms, *Coll. Antropol.* 33 (2009) 687–699.
- [8] A.A. Moskalev, A.M. Aliper, Z. Smit-McBride, A. Buzdin, A. Zhavoronkov, Genetics and epigenetics of aging and longevity, *Cell Cycle* 13 (2014) 1063–1077.
- [9] A. Dillin, E. Cohen, Ageing and protein aggregation-mediated disorders: from invertebrates to mammals, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 366 (2011) 94–98.
- [10] R. Morales, K.M. Green, C. Soto, Cross currents in protein misfolding disorders: interactions and therapy, *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 8 (2009) 363–371.
- [11] D.C. David, N. Ollikainen, J.C. Trinidad, M.P. Cary, A.L. Burlingame, C. Kenyon, Widespread protein aggregation as an inherent part of aging in *C. elegans*, *PLoS Biol.* 8 (2010).
- [12] P. Reis-Rodrigues, G. Czerwieniec, T.W. Peters, U.S. Evani, S. Alavez, E.A. Gaman, M. Vantipalli, S.D. Mooney, B.W. Gibson, G.J. Lithgow, R.E. Hughes, Proteomic analysis of age-dependent changes in protein solubility identifies genes that modulate lifespan, *Aging Cell.* 11 (2012) 120–127.
- [13] T.W. Peters, M.J. Rardin, G. Czerwieniec, U.S. Evani, P. Reis-Rodrigues, G.J. Lithgow, S.D. Mooney, B.W. Gibson, R.E. Hughes, Tor1 regulates protein solubility in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Biol. Cell.* 23 (2012) 4679–4688.
- [14] Y. Volovik, M. Maman, T. Dubnikov, M. Bejerano-Sagie, D. Joyce, E.A. Kapernick, E. Cohen, A. Dillin, Temporal requirements of heat shock factor-1 for longevity assurance, *Aging Cell.* 11 (2012) 491–499.
- [15] N. Arantes-Oliveira, J. Apfeld, A. Dillin, C. Kenyon, Regulation of life-span by germ-line stem cells in *Caenorhabditis elegans*, *Science* 295 (2002) 502–505.
- [16] D. Vilchez, I. Morante, Z. Liu, P.M. Douglas, C. Merkwirth, A.P.C. Rodrigues, G. Manning, A. Dillin, RPN-6 determines *C. elegans* longevity under proteotoxic stress conditions, *Nature* 489 (2012) 263–268.
- [17] K. Rajalingam, I. Dikic, Healthy ageing through regulated proteostasis, *EMBO J.* 30 (2011) 2983–2985.
- [18] T. Ben-Gedalya, E. Cohen, Quality control compartments coming of age, *Traffic* 13 (2012) 635–642.
- [19] R.I. Morimoto, Stress, aging, and neurodegenerative disease, *N. Engl. J. Med.* 355 (2006) 2254–2255.
- [20] S.D. Westerheide, J. Anckar, S.M. Stevens, L. Sistonen, R.I. Morimoto, Stress-inducible regulation of heat shock factor 1 by the deacetylase SIRT1, *Science* 323 (2009) 1063–1066.
- [21] K. Cuanalo-Contreras, A. Mukherjee, C. Soto, Role of protein misfolding and proteostasis deficiency in protein misfolding diseases and aging, *Int. J. Cell Biol.* 2013 (2013).
- [22] M. Lucanic, G.J. Lithgow, S. Alavez, Pharmacological lifespan extension of invertebrates, *Ageing Res. Rev.* 12 (2013) 445–458.
- [23] T.-T. Ching, W.-C. Chiang, C.-S. Chen, A.-L. Hsu, Celecoxib extends *C. elegans*

- lifespan via inhibition of insulin-like signaling but not cyclooxygenase-2 activity, *Aging Cell*. 10 (2011) 506–519.
- [24] S. Abbas, M. Wink, Epigallocatechin gallate inhibits beta amyloid oligomerization in *Caenorhabditis elegans* and affects the daf-2/insulin-like signaling pathway, *Phytomedicine* 17 (2010) 902–909.
 - [25] S. Alavez, M.C. Vantipalli, D.J.S. Zucker, I.M. Klang, G.J. Lithgow, Amyloid-binding compounds maintain protein homeostasis during ageing and extend lifespan, *Nature* 472 (2011) 226–229.
 - [26] B. Bulic, M. Pickhardt, E.-M. Mandelkow, E. Mandelkow, Tau protein and tau aggregation inhibitors, *Neuropharmacology* 59 (2016) 276–289.
 - [27] B.Y. Feng, B.H. Toyama, H. Wille, D.W. Colby, S.R. Collins, B.C.H. May, S.B. Prusiner, J. Weissman, B.K. Shoichet, Small-molecule aggregates inhibit amyloid polymerization, *Nat. Chem. Biol.* 4 (2008) 197–199.
 - [28] C. Lendel, C.W. Bertocini, N. Cremades, C.A. Waudby, M. Vendruscolo, C.M. Dobson, D. Schenk, J. Christodoulou, G. Toth, On the mechanism of nonspecific inhibitors of protein aggregation: dissecting the interactions of alpha-synuclein with Congo red and lacmoid, *Biochemistry* 48 (2009) 8322–8334.
 - [29] J.N. Rao, V. Dua, T.S. Ulmer, Characterization of alpha-synuclein interactions with selected aggregation-inhibiting small molecules, *Biochemistry* 47 (2008) 4651–4656.
 - [30] S. Taniguchi, N. Suzuki, M. Masuda, S. Hisanaga, T. Iwatsubo, M. Goedert, M. Hasegawa, Inhibition of heparin-induced tau filament formation by phenothiazines, polyphenols, and porphyrins, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 7614–7623.
 - [31] M. Necula, R. Kaye, S. Milton, C.G. Glabe, Small-molecule inhibitors of aggregation indicate that amyloid beta oligomerization and fibrillization pathways are independent and distinct, *J. Biol. Chem.* (2007) 10311–10324.
 - [32] A. Barret, F. Tagliavini, G. Forloni, C. Bate, M. Salmons, L. Colombo, A. De Luigi, L. Limido, S. Suardi, G. Rossi, F. Auvré, K.T. Adjou, N. Salès, A. Williams, C. Lasmézas, J.P. Deslys, Evaluation of quinacrine treatment for prion diseases, *J. Virol.* 77 (2003) 8462–8469.
 - [33] G.M. Solis, M. Petrascheck, Measuring *Caenorhabditis elegans* life span in 96 well microtiter plates, *J. Vis. Exp.* 18 (49) (2011).
 - [34] G.L. Sutphin, M. Kaerberlein, Measuring *Caenorhabditis elegans* life span on solid media, *J. Vis. Exp.* (27) (2009) 1152.
 - [35] S.K. Han, D. Lee, H. Lee, D. Kim, H.G. Son, J.-S. Yang, S.-J.V. Lee, S. Kim, OASIS 2: online application for survival analysis 2 with features for the analysis of maximal lifespan and healthspan in aging research, *Oncotarget* (2016) 11269.
 - [36] Z. Pincus, F.J. Slack, Developmental biomarkers of aging in *Caenorhabditis elegans*, *Dev. Dyn.* 239 (2010) 1306–1314.
 - [37] D. Raizen, B.-M. Song, N. Trojanowski, Y.-J. You, Methods for Measuring Pharyngeal Behaviors, 2012.
 - [38] A. Ben-Zvi, E.A. Miller, R.I. Morimoto, Collapse of proteostasis represents an early molecular event in *Caenorhabditis elegans* aging, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 14914–14919.
 - [39] M. Landau, M.R. Sawaya, K.F. Faull, A. Laganowsky, L. Jiang, S.A. Sievers, J. Liu, J.R. Barrio, D. Eisenberg, Towards a pharmacophore for amyloid, *PLoS Biol.* 9 (2011).
 - [40] S.A. Sievers, J. Karanicolas, H.W. Chang, A. Zhao, L. Jiang, O. Zirafi, J.T. Stevens, J. Münch, D. Baker, D. Eisenberg, Structure-based design of non-natural amino-acid inhibitors of amyloid fibril formation, *Nature* 475 (2011) 96–100.
 - [41] Y. Porat, A. Abramowitz, E. Gazit, Inhibition of amyloid fibril formation by polyphenols: structural similarity and aromatic interactions as a common inhibition mechanism, *Chem. Biol. Drug Des.* 67 (2006) 27–37.
 - [42] F. Yang, G.P. Lim, A.N. Begum, O.J. Ubeda, M.R. Simmons, S.S. Ambegaokar, P.P. Chen, R. Kaye, C.G. Glabe, S.A. Frautschy, G.M. Cole, Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 5892–5901.
 - [43] K. Cisek, G.L. Cooper, C.J. Huseby, J. Kuret, Structure and mechanism of action of tau aggregation inhibitors, *Curr. Alzheimer Res.* 11 (2014) 918–927.
 - [44] B. Bulic, M. Pickhardt, I. Khlistunova, J. Biernat, E.-M. Mandelkow, E. Mandelkow, H. Waldmann, Rhodanine-based tau aggregation inhibitors in cell models of tauopathy, *Angew. Chem. Int. Ed.* 46 (2007) 9215–9219.
 - [45] B. Bolognesi, J.R. Kumita, T.P. Barros, E.K. Esbjorner, L.M. Luheshi, D.C. Crowther, M.R. Wilson, C.M. Dobson, G. Favrin, J.J. Yerbury, ANS binding reveals common features of cytotoxic amyloid species, *ACS Chem. Biol.* 5 (2010) 735–740.
 - [46] T. Yoshimura, [6] Monitoring protein conformational changes during membrane fusion, *Methods Enzymol.* 221 (1993) 72–82.
 - [47] L.R.C. Barclay, M.R. Vinqvist, K. Mukai, H. Goto, Y. Hashimoto, A. Tokunaga, H. Uno, On the antioxidant mechanism of Curcumin: classical methods are needed to determine antioxidant mechanism and activity, *Org. Lett.* (2000) 2841–2843.
 - [48] S.-J. Wang, Y. Tong, S. Lu, R. Yang, X. Liao, Y.-F. Xu, X. Li, Anti-inflammatory activity of myricetin isolated from *Myrica rubra* Sieb. et Zucc. leaves, *Planta Med.* 76 (2010) 1492–1496.
 - [49] S. Turnbull, B.J. Tabner, D.R. Brown, D. Allsop, Quinacrine acts as an antioxidant and reduces the toxicity of the prion peptide PrP106–126, *Neuroreport* 14 (2003) 1743–1745.
 - [50] H.R. Brignull, F.E. Moore, S.J. Tang, R.I. Morimoto, Polyglutamine proteins at the pathogenic threshold display neuron-specific aggregation in a Pan-Neuronal *Caenorhabditis elegans* model, *J. Neurosci.* 26 (2006) 7597–7606.
 - [51] J.N. Pitt, M. Kaerberlein, Why is aging conserved and what can we do about it? *PLoS Biol.* 13 (2015).
 - [52] D. Chow, C. Glenn, J. Johnston, I. Goldberg, C. Wolkow, Sarcopenia in the *Caenorhabditis elegans* pharynx correlates with muscle contraction rate over lifespan, *Exp. Gerontol.* 41 (2006) 252–260.