



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL
Unidad Distrito Federal**

UNIDAD ZACATENCO

Departamento de Genética y Biología Molecular

“Efecto anti-senescente de Leptomicina B en el síndrome de
Progeria”

Tesis que presenta

Q.F.B. IAN ALAIN GARCÍA AGUIRRE

Para obtener el Grado de

Maestro en ciencias

en la Especialidad de
Genética y Biología Molecular

**Director de la Tesis
Dr. Bulmaro Cisneros Vega**

México, Distrito Federal

Agosto del 2017

Este trabajo fué realizado en el departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N bajo la tutoría del Dr. Bulmaro Cisneros Vega y la asesoría del Dr. José Efraín Garrido Gerrero del departamento de Genética y Biología Molecular y el Dr. Francisco García Sierra del departamento de Biología Celular.

El presente trabajo fue apoyado por el CONACyT a través del proyecto 237123.

Durante la realización del mismo, el estudiante Ian Alain García Aguirre fue apoyado como becario del CONACyT con el número de registro 591188.

Agradecimientos:

Agradezco a mis padres por todo el apoyo, cariño y ánimo brindado desde siempre, sin ellos nada de esto hubiese sido posible.

Gracias a toda mi familia por su apoyo incondicional, muchas gracias a todos.

Muchas gracias Daniela, mi amor, por apoyarme en todas mis locuras. Te amo.

Muchas gracias Chano, Fer e Ivan por ser parte de este pequeño grupo llamado los 4WHJ, algo que sólo nosotros entendemos. Hicimos un excelente equipo, gracias.

Muchísimas gracias Dr. Bulmaro, por su apoyo, consejos, dirección, regaños, exigencia, etc. Muchas gracias por creer en mí.

A mis asesores: Dr. Efraín y Dr. Francisco, por su apoyo, sus observaciones, sus preguntas, por ser exigentes conmigo y por estar siempre disponibles para asesorarme durante el presente trabajo. Muchas gracias.

Muchas gracias a todos mis amigos por su apoyo y comprensión.

A mi maestra Nelly por estar siempre allí, pendiente, por compartirme sus conocimientos, asesorarme, apoyarme, por ser exigente conmigo y presionarme. Gracias maestra.

A JDD por sus consejos, su apoyo y por preguntarme tanto en mis seminarios, de verdad lo aprecio mucho y por ser un gran amigo.

A Gris por estar siempre disponible ante cualquier duda y por sus sabios consejos. Gracias.

A Pablo por su ayuda, apoyo, consejos, preguntas y por hacer un gran trabajo para el laboratorio.

A mis demás compañeros del laboratorio: Wendy, Ari, Ely, Pau, Elianeth y Mau. Muchas gracias por su apoyo, consejos, etc. Muchas gracias.

A todos los grandes amigos que gracias a este trabajo pude conocer: Raul, Arti, Anza, Roberto, muchas gracias por su amistad y por esos grandes momentos, ustedes saben.

Resumen: El Síndrome de Progeria Hutchinson-Gilford (HGPS), caracterizado por envejecimiento prematuro y acelerado, es causado por una mutación en el gen que codifica para la lámina A/C, lo que genera la síntesis de una proteína mutante denominada Progerina. La Progerina altera la estructura y función del núcleo y consecuentemente altera diferentes procesos celulares. Se han desarrollado distintas estrategias para eliminar a la Progerina o bloquear su función aberrante que no han funcionado en la clínica, lo que sugiere que es necesario profundizar más en el estudio del HGPS para identificar moléculas diana para terapias emergentes. Nuestro grupo de trabajo reveló que el mecanismo de exportación nuclear de proteínas mediado por la exportina CRM1 se encuentra exacerbado en el HGPS y pensamos que esta alteración podría explicar al menos en parte cómo la Progerina provoca la variedad de alteraciones celulares/moleculares. Previamente demostramos que la normalización del mecanismo de la exportación nuclear por medio del uso del inhibidor de la exportina CRM1, la Leptomicina B (LMB), normaliza la localización nuclear de distintas proteínas y alivia el estrés nucleolar presente en las células HGPS. En el presente trabajo analizamos si el tratamiento con la LMB alivia la senescencia celular, característica distintiva del HGPS. Encontramos que el tratamiento con la LMB disminuyó el número de células senescentes, identificadas mediante la medición de la actividad de la enzima β -galactosidasa asociada a senescencia; en contraste, un fármaco empleado en la clínica del HGPS (FTI-277) no alivió el fenotipo senescente. Con la finalidad de profundizar sobre el mecanismo molecular que permite el alivio de la senescencia celular, evaluamos si el tratamiento con la LMB tiene un efecto sobre los niveles de la lámina B1, proteína maestra anti-senescencia. De manera interesante, encontramos que el tratamiento con la LMB aumentó los niveles de la lámina B1 y alivió la morfología celular senescente (células extendidas y aplanadas) en los fibroblastos HGPS. Debido a que la lámina B1 controla la plasticidad de los nucléolos, la recuperación de sus niveles podría ser la base también del alivio del estrés nucleolar que promueve el tratamiento con LMB. En su conjunto nuestros resultados nos permiten plantear a la exportina CRM1 como un blanco terapéutico para el HGPS y específicamente para aliviar el fenotipo senescente, lo que tiene implicación en la disfunción cardiovascular asociada al envejecimiento fisiológico y al HGPS.

Abstract: Hutchinson and Gilford progeria syndrome (HGPS) is a disease characterized by premature and accelerated aging caused by a mutation in the LMNA gene. Such mutation activates a cryptic splicing site that in turn generates the mutant protein called Progerin. Progerin interferes with Lamin A function, which results in a plethora of altered cellular functions. Therapeutic strategies aimed to eliminate the aberrant function of Progerin have failed in clinical assays, which imply that a deeply study of the HGPS is required to identify key molecules for therapeutic developments. In this context, our lab has revealed that the CRM1-mediated nuclear protein export pathway is exacerbated in the HGPS and such alteration might be part of the basis of the disease phenotype. We previously demonstrated that normalization of the nuclear export mechanism, using the CRM1 inhibitor Leptomycin B (LMB), alleviates the nucleolar stress present in the HGPS cells. In the present work, we analyzed whether this treatment can rescue the HGPS-associated senescence. We observed that LMB-treatment decreased the number of senescent cells, identified by the activity of the β -galactosidase associated with senescence. In contrast, a drug widely used in the clinics of HGPS (FTI-277) failed to alleviate senescence. Furthermore, LMB-treatment also alleviated the senescent morphology of HGPS fibroblasts, which consists in a flat, extended cell morphology. To ascertain the molecular basis that allows LMB to alleviate senescence, we ascertained whether such treatment has an effect on Lamin B1 levels; Lamin B1 is a key anti-senescence molecule. Interestingly, treatment with LMB increased the levels of Lamin B1 in the HGPS cells. Since Lamin B1 is involved in nucleoli plasticity, the recovery of its levels could be also the basis of the LMB-mediated nucleolar stress prevention. Overall our results point at CRM1 as a therapeutic target for HGPS and specifically to alleviate the senescent phenotype implicated in the cardiovascular dysfunction associated with both physiological and HGPS-related aging.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	6
ÍNDICE DE FIGURAS	8
1. INTRODUCCIÓN	10
1.1 ENVEJECIMIENTO	10
1.2 SÍNDROMES PROGEROIDES	11
1.3 HGPS	12
1.4 FENOTIPOS RELACIONADOS CON EL HGPS	15
1.4.1 PÉRDIDA DE HETEROCROMATINA PERINUCLEAR.....	16
1.4.2 DAÑO EN TELÓMEROS	17
1.4.3 DAÑO AL DNA.....	17
1.4.4 ESTRÉS NUCLEOLAR	18
1.4.5 DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL.....	19
1.4.6 SENESCENCIA CELULAR.....	20
1.5 TERAPIAS PARA EL HGPS	25
2. ANTECEDENTES DIRECTOS	27
3. JUSTIFICACIÓN	32
4. HIPÓTESIS	32
5. OBJETIVOS	33
5.1 OBJETIVO GENERAL:	33
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	33
6. MODELO DE ESTUDIO	34
7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	35
8. MATERIALES Y MÉTODOS	36
8.1 CULTIVO CELULAR	36
8.2 INMUNOFLUORESCENCIA ACOPLADO y MICROSCOPIO CONFOCAL	36
8.3 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES	37
8.4 INMUNODETECCION EN FASE SOLIDA	37
8.7 CITOQUÍMICA DE LAS CÉLULAS SENESCENTES	38
9. RESULTADOS	39
9.1 Caracterización de los fibroblastos de individuos con Progeria	39

9.2	El porcentaje de células senescentes (positivas para la tinción SA-βgal) aumenta conforma avanza el número de pasajes de los fibroblastos HGPS.....	41
9.3	El tratamiento con LMB (inhibidor de la exportina CRM1) disminuyó el porcentaje de células senescentes en los fibroblastos con el HGPS.....	43
9.4	La inhibición de la farnesilación de la Progerina no disminuye el porcentaje de células senescentes en los fibroblastos HGPS.	45
9.5	Disminución de la Lámina B1 en fibroblastos con el HGPS.....	48
9.6	El tratamiento con LMB recupera los niveles de la lámina B1 en los fibroblastos HGPS.....	51
9.7	Los fibroblastos HGPS presentan una morfología senescente.....	53
9.8	El tratamiento con LMB revierte la morfología celular senescente de los fibroblastos HGPS.....	54
9.9	Establecimiento de la dosis mínima de LMB que corrige la exportación nuclear de proteínas	55
10.	DISCUSIÓN.....	57
11.	CONCLUSIÓN.....	60
12.	BIBLIOGRAFÍA	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Signos característicos del envejecimiento	11
Figura 2. Mutación en gen LMNA que altera el procesamiento post-traducciona de la lámina A y genera la proteína mutante denominada progerina	13
Figura 3. Consecuencias funcionales de la expresión de progerina	14
Figura 4. Principales características clínicas del HGPS	15
Figura 5. Alteraciones moleculares del síndrome de progeria	16
Figura 6. Marco de referencia para entender el impacto del estrés oxidativo sobre la función de la lámina nuclear	20
Figura 7. Marcas de una célula senescente.....	22
Figura 8. La pérdida de la Lámina B1 como un evento central para la senescencia.....	23
Figura 9. Fenotipos en el HGPS llevan a senescencia celular.....	24
Figura 10. Rutas en común para el envejecimiento cardiovascular entre el envejecimiento normal y el HGPS.....	26
Figura 11. Sobreexpresión de la exportina CRM1 en los fibroblastos HGPS	27
Figura 12. Mecanismo de exportación nuclear mediado por CRM1	28
Figura 13. La exportación nuclear exacerbada ocasiona la disminución de los niveles nucleares de diversas proteínas en los fibroblastos de individuos con el HGPS.....	30
Figura 14. El tratamiento con el inhibidor de la exportación nuclear LMB restaura la localización nuclear/nucleolar del β-DG y aminora el estrés nucleolar en los fibroblastos HGPS.....	31
Figura 15. Distribución y expresión de la Lámina A/C, la progerina y la CRM1 en los fibroblastos control y HGPS.....	41
Figura 16. Monitoreo de células SA-βgal (+) en los fibroblastos HGPS conforme el número de pasajes.....	43
Figura 17. La normalización de la exportación nuclear de proteínas mediante tratamiento con LMB disminuyó el porcentaje de células SA-βgal (+) en los fibroblastos HGPS1.	44

Figura 18. El fármaco FTI-277 alivió la morfología nuclear aberrante de los fibroblastos HGPS.....	46
Figura 19. La Inhibición de la farnesilación de la Progerina no disminuye el porcentaje de células senescentes en los fibroblastos HGPS.....	48
Figura 20. Los niveles de la Lámina B1 están disminuídos en los fibroblastos HGPS	50
Figura 21. La normalización de la exportación nuclear mediante tratamiento con LMB restauró parcialmente los niveles de la Lámina B1 en los fibroblastos HGPS	52
Figura 22. Los fibroblastos HGPS presentan una morfología celular característica de las células senescentes.....	53
Figura 23. La normalización de la exportación nuclear de proteínas mediante tratamiento con LMB alivia la morfología senescente en los fibroblastos HGPS	54
Figura 24. Tiempo y concentración mínima del tratamiento con LMB que genera la acumulación nuclear de p53	56

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ENVEJECIMIENTO

El envejecimiento es un proceso degenerativo del cual aún no se conocen las causas que lo originan. Se piensa que el daño acumulado por la edad genera un deterioro en la fisiología del individuo que puede tener su origen en alteraciones celulares y consecuentemente un daño tisular, desencadenando finalmente la muerte. Además, el envejecimiento incrementa la susceptibilidad de padecer ciertas enfermedades crónicas, incluyendo desórdenes neurológicos, cardiovasculares y cáncer (Marín G. J. 2012; Rodriguez M. et al., 2015; Johnson S. C. et al., 2015).

Se han propuesto distintas teorías a nivel celular/molecular para explicar el envejecimiento, como la disfunción mitocondrial, el daño de los telómeros, la pérdida de heterocromatina, y daño al DNA, etc. (Kirkwood T. B. y Austed S. N. 2000; Bratic A. y Larsson N.G. 2013; Seo A. Y. et al., 2010; Sahin E. y DePinho R. A. 2012; Pegoraro G. y Misteli T. 2009; Tsurumi A y Li W. 2012). La disección de los mecanismos moleculares y factores genéticos que subyacen el envejecimiento seguramente ayudará a identificar dianas farmacéuticas que permitan retrasar el curso de este proceso degenerativo, y evitar la aparición de enfermedades asociadas con la vejez (López-Otín et al., 2013) (Fig. 1).



Figura 1. Signos característicos del envejecimiento. En el esquema se enumeran los 9 signos característicos del envejecimiento: inestabilidad genómica, desgaste de telómeros, alteraciones epigenéticas, pérdida de proteostasis, desregulación en la detección de nutrientes, disfunción mitocondrial, senescencia celular, agotamiento de células madre y alteración de la comunicación intercelular (López-Otín et al., 2013).

1.2 SÍNDROMES PROGEROIDES

Un nuevo campo de estudio que podría ser clave para entender el envejecimiento, es el estudio de los síndromes Progeroides, los cuales son desordenes humanos genéticos que se caracterizan por presentar envejecimiento acelerado. En estos síndromes, el envejecimiento prematuro no es completo ya que algunas características de la vejez no se presentan. La mayoría de los síndromes humanos de envejecimiento acelerado son causados por uno o dos mecanismos moleculares principales: defectos en los sistemas de reparación del DNA y alteraciones en las proteínas de la lámina nuclear (Cau, P. et al., 2014).

1.3 HGPS

Uno de estos síndromes de envejecimiento prematuro es el de la progeria Hutchinson-Gilford (HGPS por sus siglas en inglés; Hutchinson-Gilford progeria syndrome), el cual es causada por una mutación puntual en el gen LMNA que ocasiona el cambio de una C por una T en el exón 11 (1824C>T). Funcionalmente, la mutación provoca la activación de un sitio donador de splicing, críptico y consecuentemente, la eliminación de 50 aminoácidos de la proteína lamina A, producto de gen LMNA.

La lamina A presenta diversas modificaciones post-traduccionales que le permiten adquirir su forma funcional. La maduración de la lámina A requiere la farnesilación transitoria de la cisteína C-terminal y la posterior remoción del residuo modificado. Dentro de la región de la proteína que se elimina, debido a la activación del sitio críptico de splicing, se localiza la secuencia de aminoácidos que es necesaria para que la endoproteasa FACE1/ZMPSTE24 remueva la cisteína farnesilada; por lo tanto, la lámina A mutante, denominada Progerina, permanece aberrantemente farnesilada (Cau, P. et al., 2014; Eriksson et al., 2003; Capell y Collins, 2006; Capell, B. C. et al., 2007) (Fig. 2). La Progerina se ancla incorrectamente a la membrana nuclear generando diversas alteraciones en la arquitectura y función del núcleo, incluyendo la disrupción de la morfología nuclear, desorganización de la cromatina, alteraciones en la expresión de genes y en la mitosis (Goldman R. D. et al., 2004; Liu B. et al., 2005; McCord R. P. et al., 2013; Stancheva y Schirmer, 2014; Capell, B. C. et al., 2007) (Fig.3).

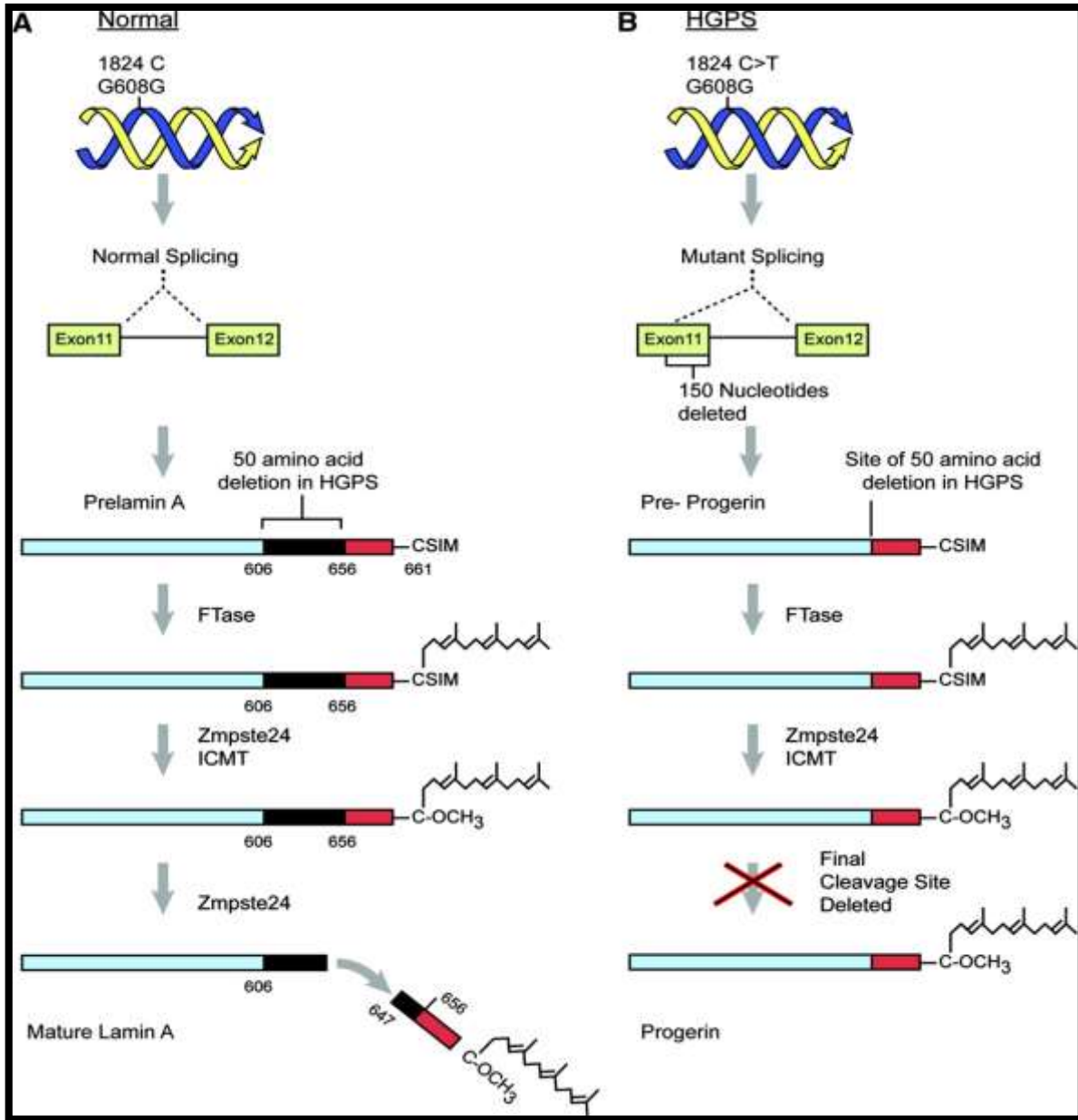


Figura 2. Mutación en gen LMNA que altera el procesamiento post-traduccional de la lámina A y genera la proteína mutante denominada progerina. (B) (Capell, B. C. et al., 2007).

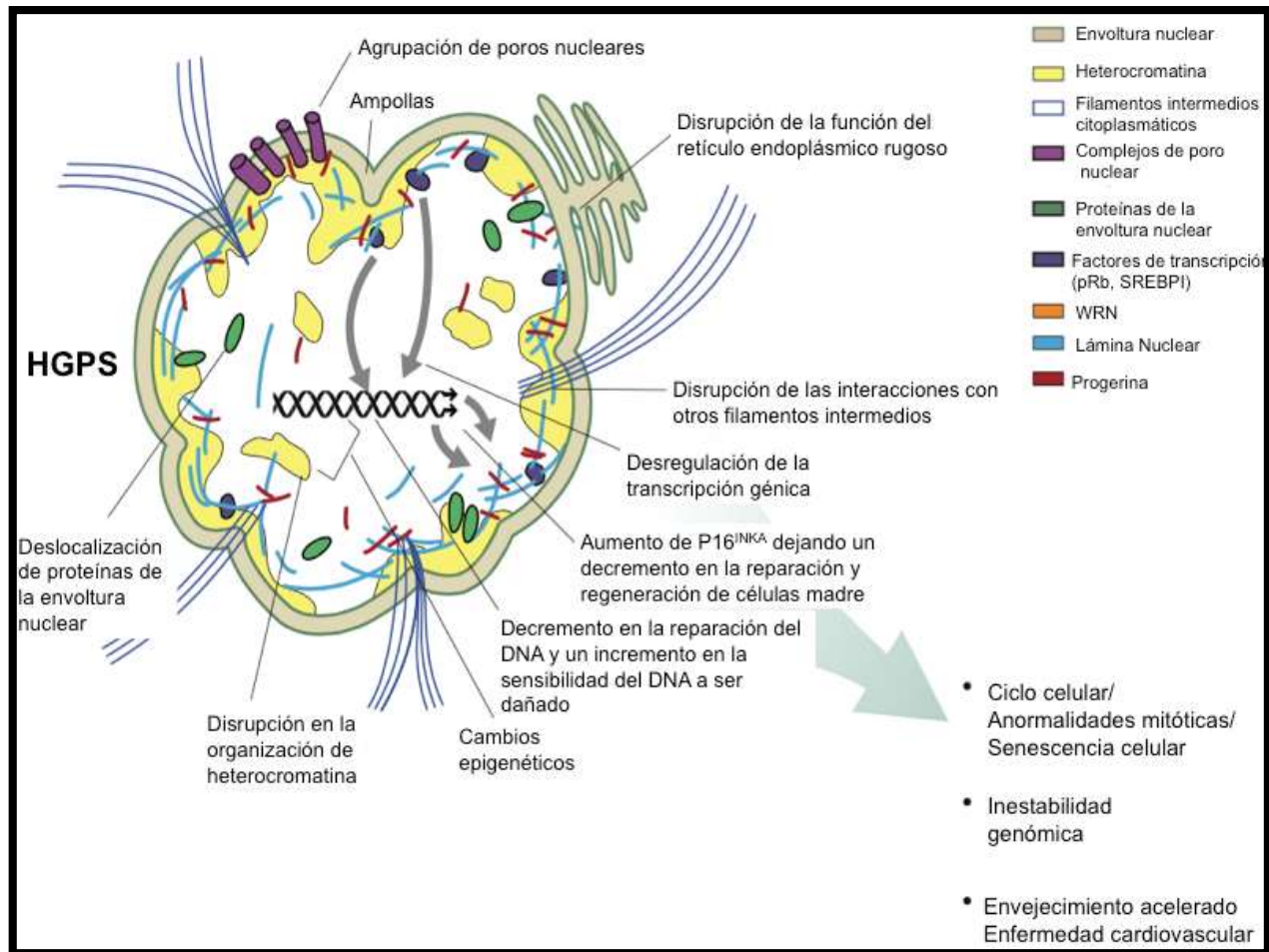


Figura 3. Consecuencias funcionales de la expresión de Progerina. (Tomada y traducida de Capell, B. C. et al., 2007).

El HGPS es extremadamente raro, tiene una prevalencia de $\frac{1}{4-8}$ millones (revisado en Cau, P. et al., 2014). El fenotipo clínico se caracteriza por un severo retraso en el crecimiento, usualmente asociado con alteraciones en el esqueleto (osteolisis, osteoporosis), osteopenia, amiotrofia, lipodistrofia, piel rígida y alopecia. El dismorfismo facial típico incluye micrognacia, venas del cuero cabelludo prominentes y nariz picuda. Otras características distintivas de la enfermedad son la ausencia de grasa subcutánea y afecciones del sistema cardiovascular (Worman H. J. y Bonne G. 2007). Se presentan accidentes cerebrovasculares frecuentemente alrededor de los 9 años de edad y el infarto al miocardio es la causa más frecuente de muerte a una edad promedio de 13.5 años (revisado en Cau, P. et al., 2014) (Fig. 4).


Fenotipo	Gen	Mutación (referencia)
<p>Procesamiento deficiente de prelamina A</p> <p>Hutchinson-Gilford Progeria syndrome (HGPS) - progerina</p>  <ul style="list-style-type: none"> • Retraso en el crecimiento • Nariz puntiaguda • Micrognacia • Alopecia/cabello escaso • Osteolisis • Osteopenia • Lipoatrofia subcutánea • Pigmentación anormal de piel • Enfermedad arterioesclerótica 	LMNA	<p>c.1824C>T, p.G608G dominante, <i>de novo</i></p> <p>OMIM 176670</p> <p>[139] [140]</p>

Figura 4. Principales características clínicas del HGPS. (Tomado y traducido de Cau, P. et al., 2014).

1.4 FENOTIPOS RELACIONADOS CON EL HGPS

Alguno de las alteraciones moleculares del HGPS incluyen el acortamiento de telómeros, la disfunción mitocondrial, senescencia, pérdida de heterocromatina perinuclear, daño al DNA y estrés nucleolar (Benson E. K. et al., 2010; Cao K. et al., 2011; Zhang J. et al., 2016; Sahin E. y DePinho R. A. 2012; Vigneron A. y Vousden K. H. 2010; Rufini A. et al., 2013; Moslehi J. et al., 2012; Marín G. J. 2012; Xiong Z. M. et al., 2015; Goldman R. D. et al., 2004; McCord R. P. et al., 2013; Chen J. H et al., 2007; Mehta I. S. 2010) (Fig. 5).

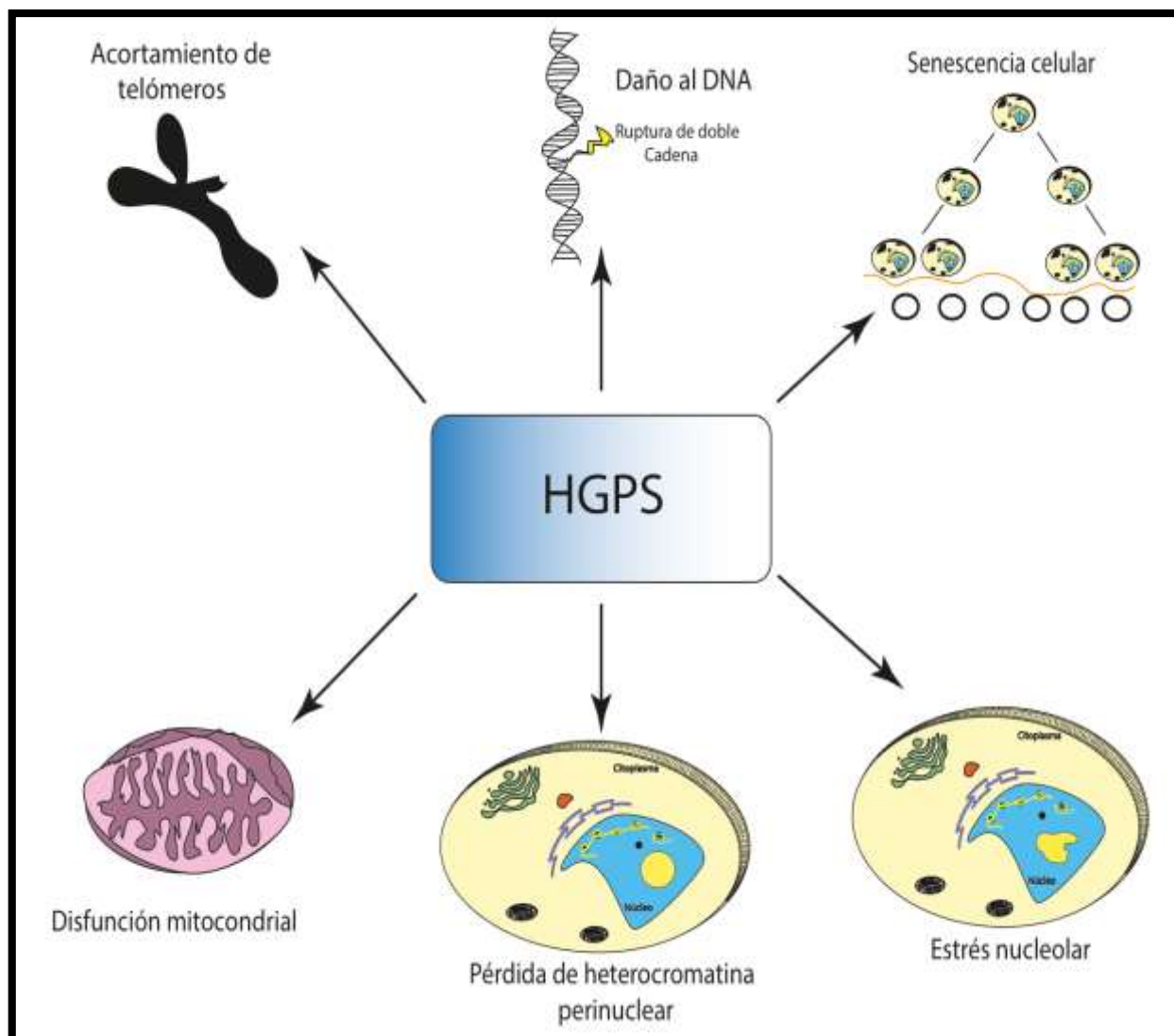


Figura 5. Alteraciones moleculares del síndrome de progeria. (Diseñado empleando Adobe Illustrator CC 2015 a partir de las siguientes fuentes bibliográficas: Benson E. K. et al., 2010; Cao K. et al., 2011; Zhang J. et al., 2016; Sahin E. y DePinho R. A. 2012; Vigneron A. y Vousden K. H. 2010; Rufini A. et al., 2013; Moslehi J. et al., 2012; Marín G. J. 2012; Xiong Z. M. et al., 2015; Goldman R. D. et al., 2004; McCord R. P. et al., 2013; Chen J. H et al., 2007; Mehta I. S. 2010).

1.4.1 PÉRDIDA DE HETEROCROMATINA PERINUCLEAR

Estudios previos han reportado que el anclaje de la Progerina a la membrana nuclear causa la pérdida de heterocromatina perinuclear en células de HGPS, también se ha reportado que la sobreexpresión de Progerina induce de manera directa la pérdida de H3K9me3 (marca epigenética) (McCord, R. P. et al., 2013; Goldman R. D. et al., 2004; Shumaker D. K. et al., 2006). Se ha descrito que la pérdida de la marca de

heterocromatina H3K9me3 lleva a senescencia (Zhang W. et al., 2015) y que la disminución de esta marca se correlaciona con una deficiencia en el sistema de reparación al DNA en el HGPS, cuya deficiencia también es una característica del envejecimiento y de las células senescentes (Zhang J. et al., 2016; Gorbunova V. et al., 2007; Lombard D. B. Et al., 2005).

1.4.2 DAÑO EN TELÓMEROS

Algunos de los defectos celulares asociados con el HGPS involucran la reducción en la longitud de los telómeros y una respuesta crónica de daño al DNA. Estudios previos han mostrado que la sobre-expresión de la subunidad catalítica de la telomerasa humana (TERT) extiende la esperanza de vida celular en el HGPS y normaliza la proliferación celular, lo que va asociado con un decremento en la activación de p53 y Rb (retinoblastoma), proteínas implicadas en las vías de supresión de tumores (Decker M. L. et al., 2009; Kudlow, B. A. et al., 2008). Es importante mencionar que los telómeros son un blanco importante ante un estrés celular en el envejecimiento y en la senescencia celular (Hewitt G. et al., 2012). De manera interesante se ha demostrado que la presencia de la Progerina en conjunto con una disfunción telomérica, genera senescencia celular (Cao K. et al., 2011).

1.4.3 DAÑO AL DNA

Como se mencionó anteriormente, el daño al DNA es característico en las células del HGPS, incluso se ha demostrado la asociación entre un incremento en el número de focos de la histona H2AX fosforilada y el acortamiento de los telómeros durante senescencia y el envejecimiento; lo que sugiere una conexión entre la senescencia celular y el acortamiento de los telómeros, ambos procesos relacionados con la reparación del DNA (di Fagagna, F. D. A. et al., 2003; Herbig, U. et al., 2004; Sedelnikova, O. A. et al., 2004). Por otra parte, se ha observado que la expresión de Progerina incrementa los niveles de la histona H2AX fosforilada (γ -H2AX) en células

HeLa, lo cual es una marca de rupturas en el DNA de doble cadena (DSB; por sus siglas en inglés; double strand break) (Manju K. et al., 2006).

Por otra parte, se ha observado que el tratamiento con el inhibidor de la enzima farnesiltransferasa (FTI; por sus siglas del inglés farnesyltransferase inhibitor), en células de pacientes con HGPS no reduce las rupturas de doble cadena ni la señalización de daño al DNA, a pesar de que si revierte de forma significativa la morfología nuclear aberrante. Lo cual sugiere que la acumulación del daño al DNA y las alteraciones en la morfología del núcleo son fenotipos independientes (Liu Y. et al., 2006).

1.4.4 ESTRÉS NUCLEOLAR

El nucléolo reacciona ante varias formas de estrés celular, lo cual perturba la transcripción de DNA ribosomal (rDNA) y el ensamblaje de ribosomas. Tanto la morfología como el tamaño del nucléolo se han relacionado con la actividad nucleolar. Es importante mencionar que la inducción de distintos tipos de estrés celular se encuentra acompañada por cambios drásticos en la organización y composición del nucléolo. Se ha reportado que la segregación nucleolar es causada por el daño al DNA. De forma interesante el contenido proteico del nucléolo es dinámico y se altera durante condiciones de estrés. Se ha demostrado que las células de pacientes con progeria exhiben desorganización nucleolar (Boulon S. et al., 2010; Lindström, M. S. and Latonen L. 2013; Mehta I. S. et al., 2010). Es importante enfatizar la participación del nucléolo como regulador de la proliferación celular, progresión del ciclo celular y replicación de la telomerasa, con lo cual se ha demostrado que la generación de alteraciones en la morfología nucleolar produce senescencia celular (Takada H. y Kurisaki A. 2015; Young A. R. et al., 2013; Boisvert F. M. et al., 2007; Hein N. et al., 2012; Rosete M. et al., 2007).

1.4.5 DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL

Las mitocondrias son organelos muy complejos que tienen un papel importante en el envejecimiento biológico (Bratic A. y Larsson N. G. 2013). La mitocondria debe mantener un balance entre los procesos de fusión y fisión para que la célula tenga una población funcional de este organelo; las mitocondrias nuevas reemplazan las mitocondrias disfuncionales que son destruidas por autofagia. La disfunción mitocondrial ocasiona un incremento en la cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de esta manera se desencadena el daño al DNA y a las proteínas (Kirkinezos I. G. y Moraes C. T. 2001).

Por lo que respecta a la relación entre la disfunción mitocondrial y el HGPS, se ha reportado que las células de pacientes que padecen diferentes laminopatías debidas a mutaciones en el gen LMNA, presentan elevados niveles de ROS y una alta susceptibilidad al estrés oxidativo (Sieprath, T. et al., 2012). De igual manera, la acumulación de Progerina induce un incremento en la cantidad de ROS y una reducción en los niveles de enzimas antioxidantes, también se ha reportado que las ROS se acumulan en los fibroblastos de pacientes con HGPS (Viteri G. et al., 2010). De manera complementaria, se ha propuesto que las ROS pueden generar daño al DNA y afectar la estructura de la lámina nuclear, causando un daño oxidativo sobre los residuos de cisteína del extremo carboxilo terminal de la lámina A, e induciendo senescencia celular (Pekovic V. et al., 2011; Viteri G. et al., 2010; De Vos W. H. et al., 2011; Hutchinson C. J. 2011; Gonzalez-Suarez I. et al., 2009) (Fig 6).

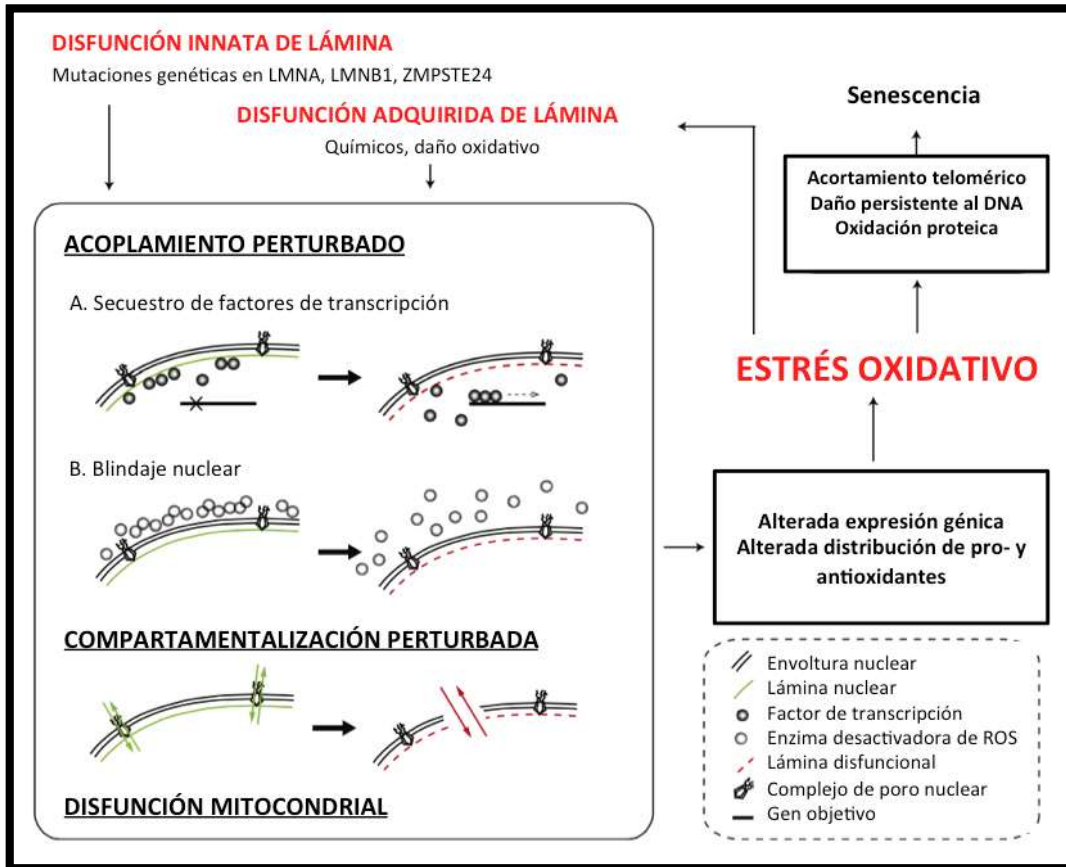


Figura 6. Marco de referencia para entender el impacto del estrés oxidativo sobre la función de la lámina nuclear (tomado y traducido de Sieprath T. et al., 2012).

1.4.6 SENESCENCIA CELULAR

La senescencia celular es un fenómeno específico donde la célula sufre un arresto permanente del ciclo celular caracterizado por una pérdida del potencial de proliferación, el cual es ocasionado por una respuesta a varios tipos de estrés celular. Las células senescentes no responden al estímulo con mitógenos y son resistentes al desafío oncogénico. Una vez establecida la senescencia es irreversible. Éste fenotipo fue descrito por primera vez en un cultivo primario de fibroblastos de humano, en donde se descubrió que dicho cultivo tiene una finita capacidad de proliferación, posicionándolo y actualmente es el modelo de senescencia celular más estudiado (Sharpless N. E. y Sherr, C. J. 2015; Campisi J. y di Fagagna, F. D. A. 2007; Muñoz-Espín D. y Serrano M. 2014; Young A. R. et al., 2013).

Las células senescentes difieren de las células quiescentes (células con potencial de proliferación que responden a mitógenos), por la presencia de distintos marcadores y cambios morfológicos. Dentro de las distintas características se incluye la ausencia de marcadores de proliferación, actividad de la enzima β -galactosidasa asociada al fenotipo senescente (SA β GAL), la expresión de supresores de tumor e inhibidores del ciclo celular, la presencia de marcadores de daño al DNA, la formación de focos nucleares constitutivos de heterocromatina, la secreción de moléculas de señalización, una disminución en los niveles de la lámina B1 (proteína de la envoltura nuclear), una elevada actividad lisosomal, alteraciones morfológicas (células aplanadas y extendidas), alteraciones en la morfología nucleolar y la presencia de estrés oxidativo, etc. (Muñoz-Espín D. y Serrano M. 2014; Dimri G. P. et al., 1995; Sharpless N. E. y Sherr, C. J. 2015; Rodier F. y Campisi J. 2011; Shah P. P. et al., 2013; Freund A. et al., 2012; Becker T. y Haferkamp S. 2013; Lee B. Y. et al., 2006; Hein N. et al., 2012; Carnero A. 2013) (Fig. 7).

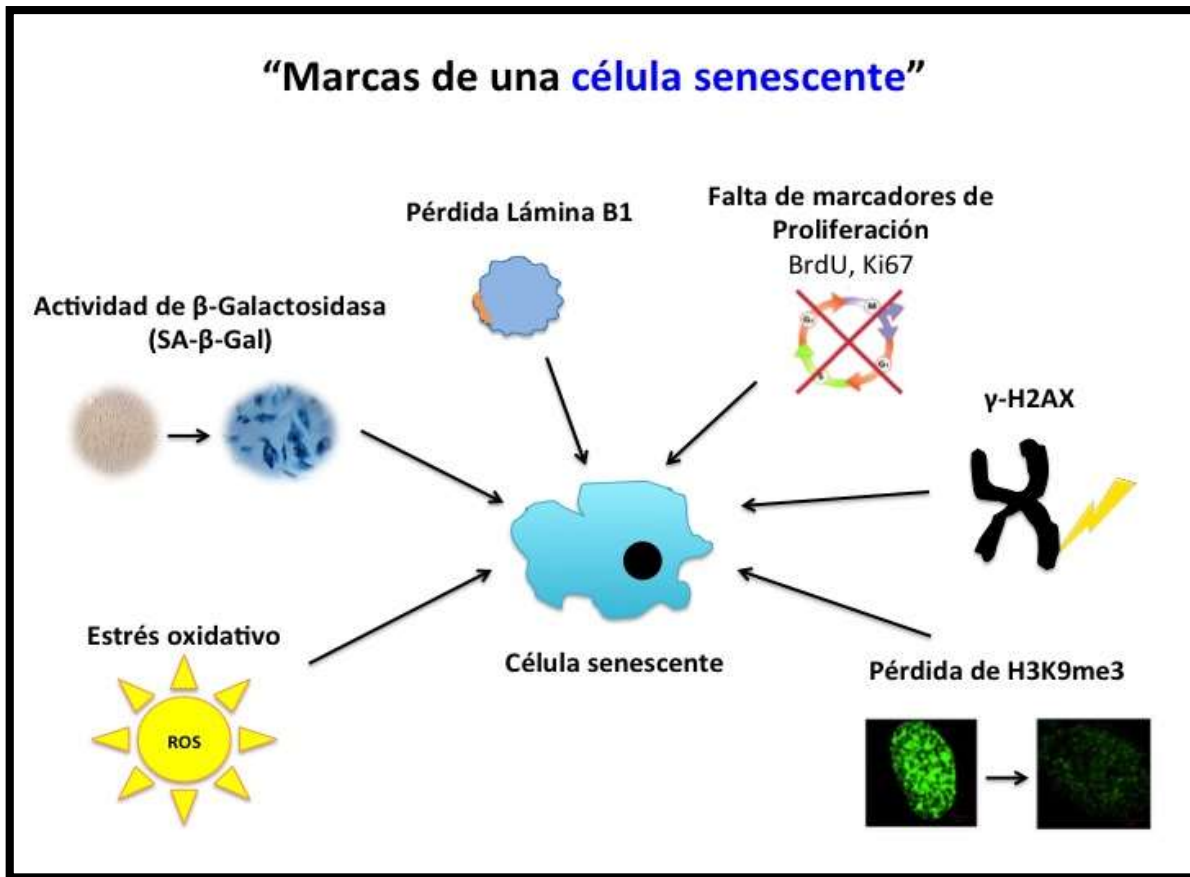


Figura 7. Marcas de una célula senescente. (Elaborado a partir de: Muñoz-Espín D. y Serrano M. 2014; Dimri G. P. et al., 1995; Sharpless N. E. y Sherr, C. J. 2015; Rodier F. y Campisi J. 2011; Shah P. P. et al., 2013; Freund A. et al., 2012; Becker T. y Haferkamp S. 2013; Lee B. Y. et al., 2006; Hein N. et al., 2012; Carnero A. 2013).

Dentro de las distintas marcas que distinguen a una célula senescente es necesario hacer énfasis en una de ellas, la pérdida de la lámina B1. La Lámina B1 regula distintos procesos celulares como: la replicación, la transcripción, el ensamblaje del huso mitótico, el estrés oxidativo, la distribución cromosómica, la reparación de daño al DNA, la estabilidad de la cromatina, la proliferación celular, el mantenimiento de la estructura y función nuclear, etc. (Freund A. et al., 2012; Shimi T. et al., 2011; Butin-israeli V. et al., 2015; Liu N. A. et al., 2015). Por lo tanto, esta proteína juega un papel muy importante en la célula más allá de ser sólo un biomarcador de la senescencia. De tal manera que la pérdida de la lámina B1 se asocia con la generación de prácticamente todas las marcas antes mencionadas del síndrome de Progeria, en donde la disminución de esta proteína podría ser un evento primario para el establecimiento de la senescencia celular (Fig. 8).

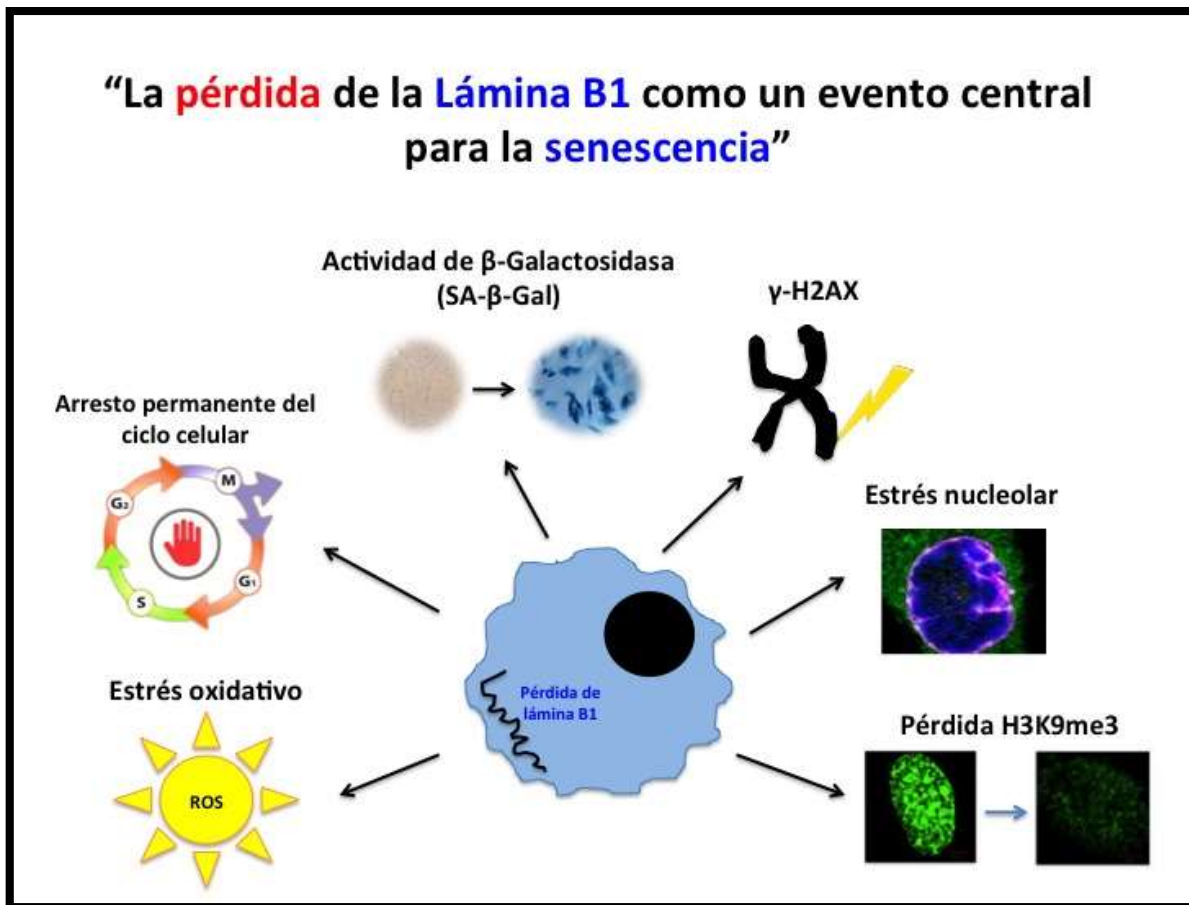


Figura 8. La pérdida de la Lámina B1 como un evento central para la senescencia. (Freund A. et al., 2012; Sadaie M. et al., 2013; Shimi T. et al., 2011; Liu N. A. et al., 2015; Martin C. et al., 2009; Shimi T. y Goldman R. D. 2014; Malhas A. N. et al., 2009).

La cantidad de estímulos conocidos que inducen senescencia está constantemente aumentando y los mecanismos involucrados han sido extensamente estudiados (Revisado de Muñoz-Espín D. y Serrano M. 2014). Con lo cual podemos establecer que la pérdida de heterocromatina perinuclear, el daño telomérico, la generación de daño al DNA, el estrés nucleolar y la disfunción mitocondrial, todas ellas marcas de la Progeria, llevan a la senescencia celular (Zhang H. et al., 2016; Gorbunova V. et al., 2007; Lombard D. B. Et al., 2005; Hewitt G. et al., 2012; Cao K. et al., 2011; di Fagagna, F. D. A. et al., 2003; Herbig, U. et al., 2004; Sedelnikova, O. A. et al., 2004; Takada H. y Kurisaki A. 2015; Young A. R. et al., 2013; Boisvert F. M. et al., 2007; Hein N. et al., 2012; Rosete M. et al., 2007; Pekovic V. et al., 2011; Viteri G. et al., 2010; De

Vos W. H. et al., 2011; Hutchinson C. J. 2011; Gonzalez-Suarez I. et al., 2009). A partir de lo antes mencionado podríamos plantear que la senescencia celular es fenotipo general del HGPS (Fig. 9).

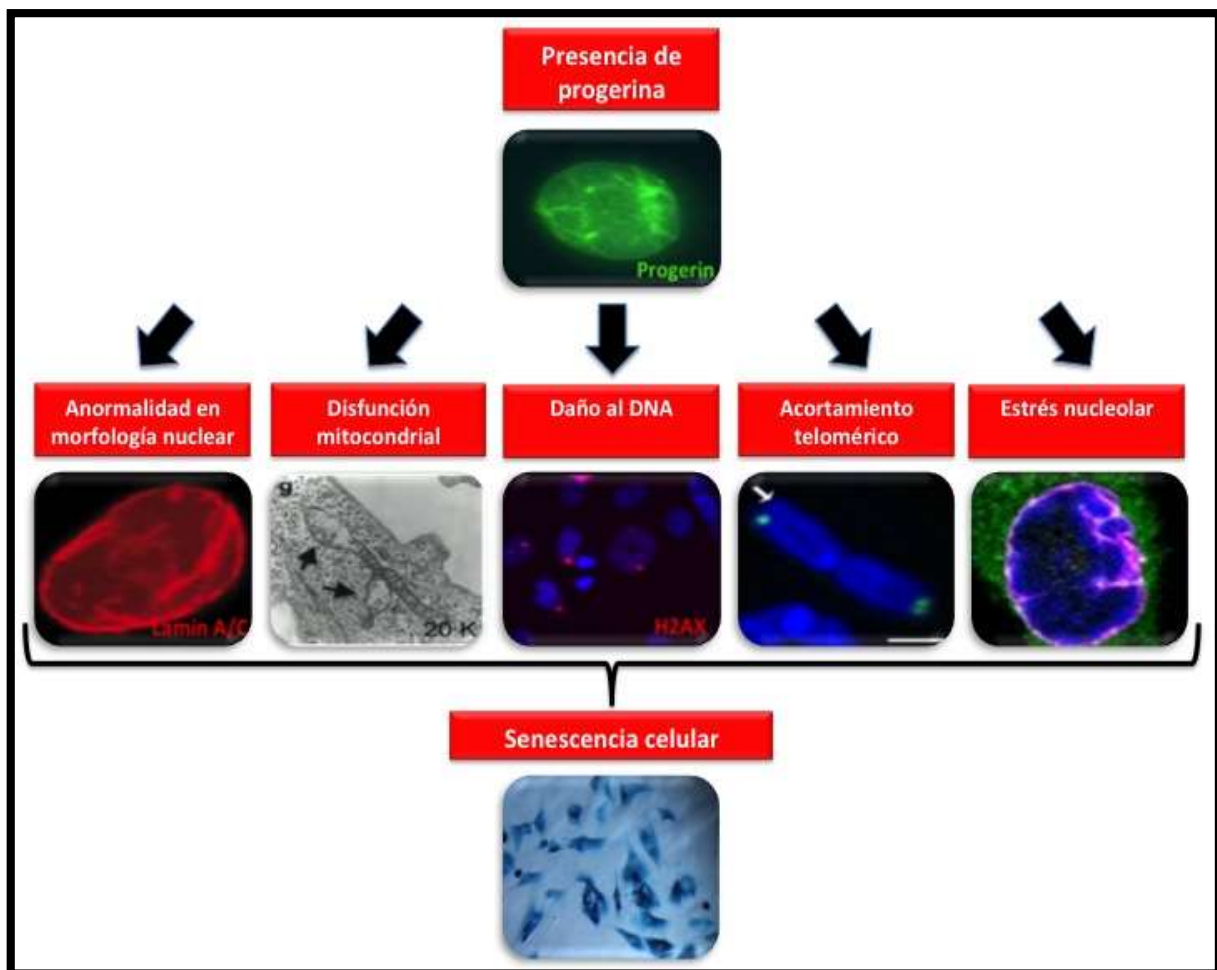


Figura 9. Fenotipos en el HGPS llevan a senescencia celular. (Realizado a partir de Zhang H. et al., 2016; Gorbunova V. et al., 2007; Lombard D. B. Et al., 2005; Hewitt G. et al., 2012; Cao K. et al., 2011; di Fagagna, F. D. A. et al., 2003; Herbig, U. et al., 2004; Sedelnikova, O. A. et al., 2004; Takada H. y Kurisaki A. 2015; Young A. R. et al., 2013; Boisvert F. M. et al., 2007; Hein N. et al., 2012; Rosete M. et al., 2007; Pekovic V. et al., 2011; Viteri G. et al., 2010; De Vos W. H. et al., 2011; Hutchinson C. J. 2011; Gonzalez-Suarez I. et al., 2009; Goldman R. D. et al., 2004).

El estudio de la senescencia celular ha cobrado gran relevancia en el estudio del envejecimiento, se ha descrito que el envejecimiento es un factor principal de riesgo para la enfermedad cardiovascular (Lakatta E. G. 2003); de manera interesante, se ha demostrado que las células cardiacas presentan senescencia y que esto

contribuye a alteraciones de la función cardiovascular (Minamino T. y Komuro I. 2008). De tal manera que la senescencia celular juega un papel importante en el envejecimiento del sistema cardiovascular (Fig. 10).

Inicialmente pacientes con el HGPS no presentan problemas cardiovasculares; sin embargo, gradualmente van presentando dificultad para respirar entre los 6 y 8 años de edad. La mortalidad en pacientes con el HGPS es frecuentemente un resultado de infarto al miocardio o eventos cerebrovasculares; los cuales ocurren en promedio a los 13 años de edad (Hennekam R. 2006). Datos obtenidos a partir de autopsias, han demostrado que en el sistema cardiovascular hay una pérdida extensiva de células musculares lisas las cuales son reemplazadas por una matriz extracelular fibrosa o por focos de calcificación; lo que da como resultado una reducida resistencia de las paredes de los vasos sanguíneos. Se ha encontrado depósitos de placa dentro de las arterias (aterosclerosis) en el HGPS, un fenotipo que se comparte con el envejecimiento fisiológico: También se ha observado la presencia de células vasculares senescentes en lesiones ateroscleróticas, sugiriendo que la senescencia celular contribuye a la patogénesis de la aterosclerosis. Sin embargo, se requieren más estudios para dilucidar los mecanismos moleculares que determinan la senescencia celular en el HGPS lo que nos ayudaría a entender el envejecimiento fisiológico (Minamino T. et al., 2004; Ikeda Y. et al., 2016; Minamino T. y Komuro I. 2008) (Fig. 10).

1.5 TERAPIAS PARA EL HGPS

El HGPS es una enfermedad incurable; no obstante, se han desarrollado diferentes estrategias terapéuticas. Se ha demostrado que la inhibición de la farnesilación de la pre-lamina A, con inhibidores de la enzima farnesil-transferasa (FITs) revierte la morfología nuclear aberrante de las células HGPS (Capell B. C. et al., 2005; Toth J. I. et al., 2005). Sin embargo, Liu Y. y colaboradores en el 2006 demostraron que el tratamiento de células de pacientes con FIT no reduce el daño al DNA, lo que sugiere que estos fenotipos son independientes. Por otro lado, se han

utilizado RNAs de interferencia (RNAi) con la finalidad de eliminar el RNA mensajero mutante o para bloquear el sitio de splicing críptico y provocar el salto de exón; sin embargo, se requiere superar la toxicidad asociada a los oligonucleótidos para escalar estas terapias a la clínica (Hegele R. A. y Oshima J. 2007). La identificación de los mecanismos moleculares por medio de los cuales se alteran diferentes procesos celulares, incluyendo la reparación del DNA, la longitud de telómeros, la producción de ROS, es un paso fundamental para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas contra el HGPS (Lattanzi G. et al., 2012).

Debido a que se propone que en el HGPS la presencia de senescencia celular prematura podría causar anomalías vasculares. Entender los mecanismos moleculares que subyacen a la senescencia celular proveerá seguramente nuevas estrategias anti-senescentes para tratar patologías cardiovasculares.

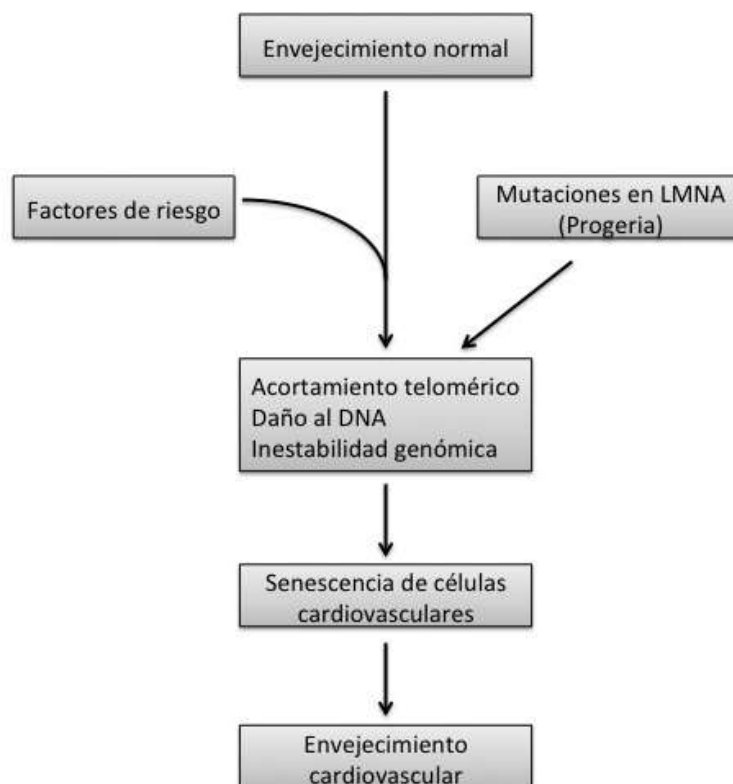


Figura 10. Rutas en común para el envejecimiento cardiovascular entre el envejecimiento normal y el HGPS. (Modificado y traducido de: Minamino T. y Komuro I. 2008).

2. ANTECEDENTES DIRECTOS

Las bases moleculares del HGPS no se han dilucidado por completo. A este respecto, nuestro grupo de trabajo demostró recientemente mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta e inmunodetección en fase sólida que los niveles de la exportina CRM1 se encuentran incrementados en los fibroblastos de individuos con HGPS, en comparación con fibroblastos de un individuo sano (Fig. 11A y 11B). Se demostró mediante ensayos de RT-PCR en tiempo real que los niveles elevados de CRM1 se deben a que existe una sobre-expresión del RNA mensajero en los fibroblastos con HGPS (Fig. 11C).

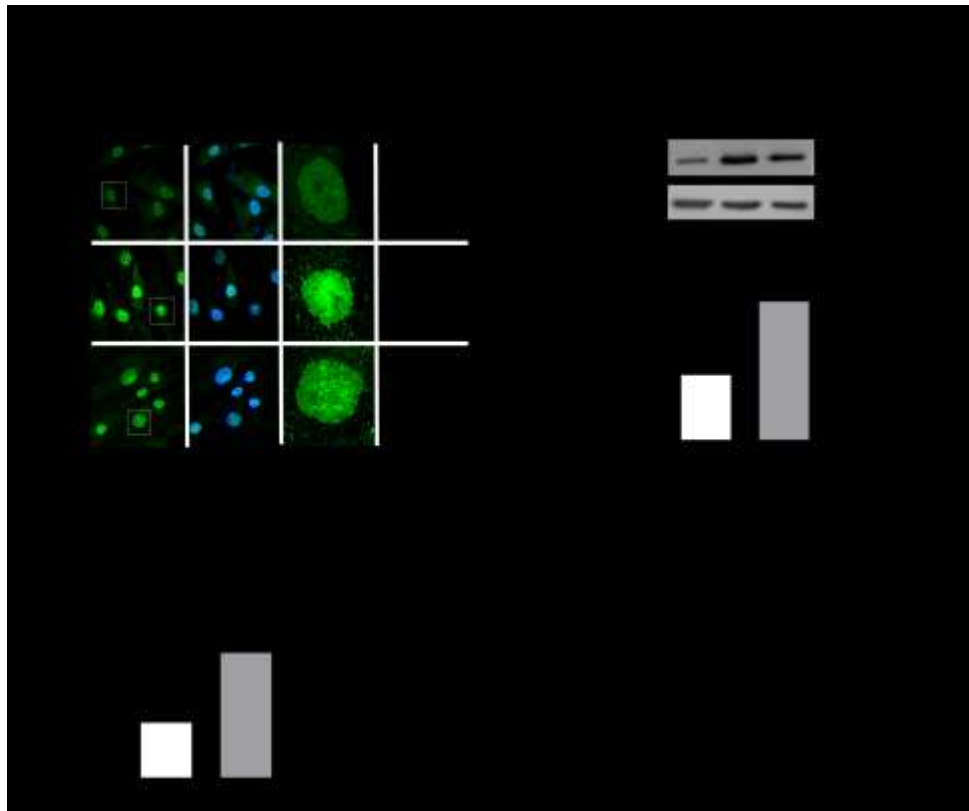


Figura 11. Sobreexpresión de la exportina CRM1 en los fibroblastos HGPS. (A) La distribución subcelular de la exportina CRM1 se examinó mediante IF indirecta utilizando anticuerpos anti-CRM1. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Se muestran imágenes representativas de tres experimentos independientes. (B) Se obtuvieron lisados de los fibroblastos normales y HGPS para su análisis posterior mediante inmunodetección en fase sólida, utilizando anticuerpos específicos para CRM1 y actina (control de carga). Se cuantificaron los niveles de CRM1, ajustándose con los niveles de actina y las diferencias significativas entre los cultivos celulares se indican con asteriscos (panel inferior). (C) Se cuantificaron los niveles del RNA mensajero de la exportina CRM1 mediante RT-PCR en tiempo real. Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Los asteriscos indican diferencias significativas.

El mecanismo de exportación nuclear es un proceso esencial que regula la localización subcelular de numerosas proteínas y RNAs en las células eucariotas. La mayor parte del tráfico de macromoléculas a través de la envoltura nuclear esta mediada por receptores de transporte nuclear. Los receptores de importación son las importinas mientras que los de exportación son llamados exportinas. Hay 7 exportinas conocidas en las células humanas. De éstas, CRM1 (por sus siglas en inglés; Chromosome region maintenance 1, conocida como exportina-1 o XPO1) es la más conocida. La exportina CRM1 reconoce la proteína cargo a través de señales de exportación nuclear (NES; por sus siglas en ingles nuclear export signal). Presente en la secuencia primaria de la proteína cargo; la NES es una secuencia corta de 5-7 residuos ricos en leucina. La exportación nuclear, puede ser inhibida por un compuesto llamado Leptomycin B (LMB), el cual se une al sitio de reconocimiento de la señal de exportación nuclear de CRM1, específicamente a la cisteína 528 (Fung, H. Y. J. y Chook Y. M. 2014; Hutten S. y Kehlenbach R. H. 2007; Kosugi S. et al., 2008; La Cour T. et al., 2004; Wen W. et al., 1995) (Fig. 12).

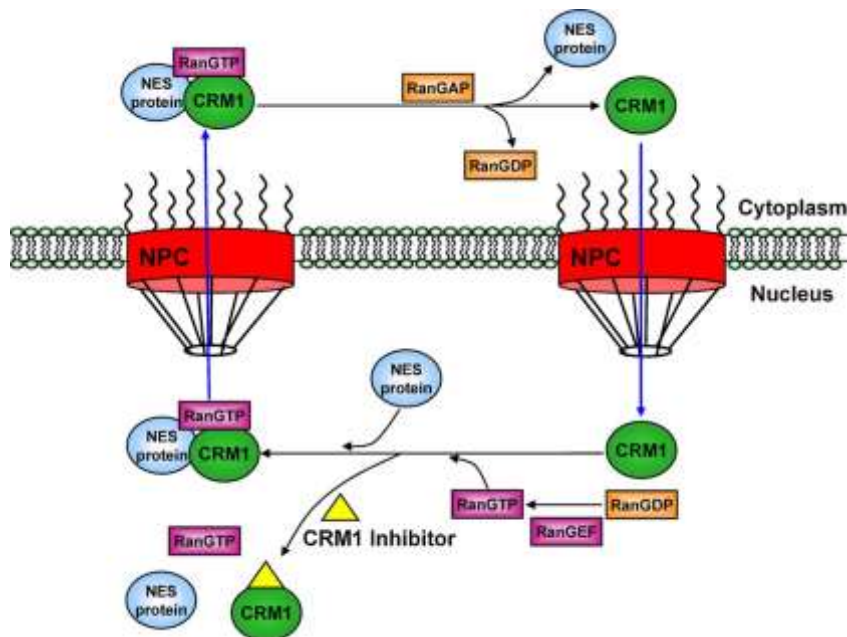


Figura 12. Mecanismo de exportación nuclear mediado por CRM1. La célula obtiene la energía necesaria para éste proceso a través de hidrólisis de GTP por la GTPasa monomérica Ran. Ran es un interruptor molecular que existe en dos estados conformacionales, dependiendo de su unión a GDP o a GTP. Éstas dos proteínas reguladoras disparan la transformación entre estos dos estados: la proteína citosólica activadora de GTPasa (GAP), que induce la hidrólisis de GTP convirtiendo de Ran-GTP en Ran-GDP y un factor nuclear intercambiador de guanina (GEF), que activa el intercambio de GDP por GTP convirtiendo Ran-GDP en Ran-GTP (tomado de Turner J. G. et al., 2012; Alberts B. B. 1996).

Existen alrededor de 300 proteínas blanco de CRM1 que han sido reportadas en la literatura y la información acerca de las NESs que contienen se encuentra en las bases de datos NESdb y ValidNESs (Xu D. et al., 2012; Fu S. C. et al., 2012).

Por lo tanto, es factible predecir que la sobreexpresión de CRM1, que ocurre en los fibroblastos de pacientes con HGPS, altera la localización nuclear de múltiples proteínas, premisa que fue probada en nuestro grupo de trabajo al analizar la distribución subcelular de tres diferentes proteínas que presentan exportación nuclear mediada por la exportina CRM1 (B23, ZO2 y STAT3). Mediante ensayos de inmunofluorescencia y microscopia confocal se observó que la señal nuclear de las tres proteínas mencionadas esta disminuida notoriamente en los cultivos de fibroblastos HGPS, en comparación con los fibroblastos control y de forma interesante los niveles nucleares de estas proteínas se recuperaron después del tratamiento con Leptomicina B (Fig. 13).

Enseguida nos interesó analizar la distribución del β -Distroglicano (β -DG) en los fibroblastos HGPS; la localización subcelular de esta proteína está regulada por los mecanismos de importación nuclear (Iara-Chacon B. et al., 2010) y de exportación nuclear (dirigido por una secuencia de exportación nuclear (NES) situada en su dominio transmembranal y la exportina CRM1). De manera interesante, la localización nucleolar y nucleoplásmica del β -DG presente en los fibroblastos control, se pierde en los fibroblastos HGPS, y el tratamiento con LMB restableció la tinción del β -DG en el nucleoplasma y los nucléolos, en los fibroblastos de pacientes con el HGPS; el análisis cuantitativo de las imágenes determinó que el número de células con tinción nucleolar del β -DG se incrementó en un 40% en ambos cultivos de fibroblastos HGPS después del tratamiento con la LMB. De forma notable, la inhibición de la exportación nuclear alivió el estrés nucleolar, ya que el volumen de los nucléolos aumentó significativamente en los fibroblastos tratados con la LMB. Dicha mejoría en la estructura nucleolar está relacionada con el regreso de ciertas proteínas al nucléolo como β -DG y B23 (proteína nucleolar con localización citoplasmática en los fibroblastos HGPS; Fig 13) (Fig. 14).

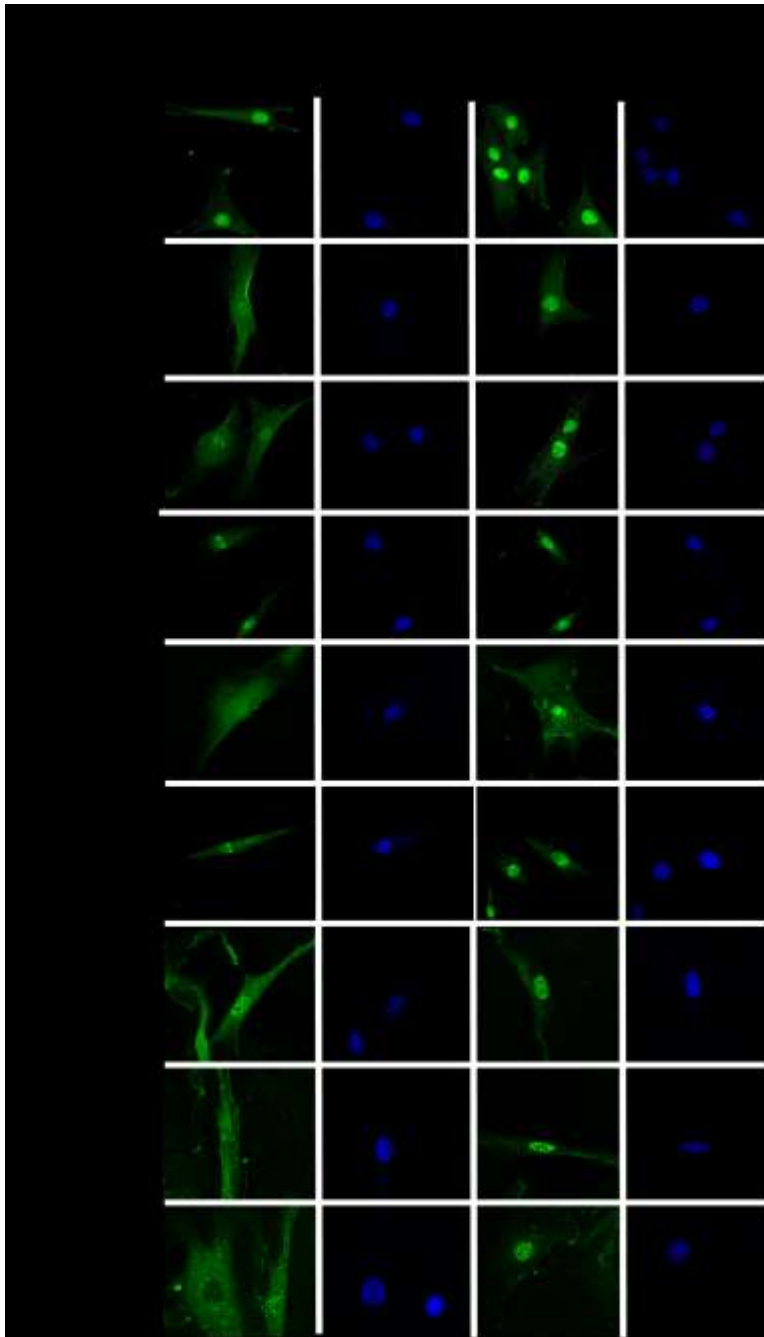


Figura 13. La exportación nuclear exacerbada ocasiona la disminución de los niveles nucleares de diversas proteínas en los fibroblastos de individuos con el HGPS. Los cultivos de fibroblastos primarios de individuos con el HGPS y de un individuo sano se cultivaron sobre cubreobjetos y se trataron durante 6 días con 50 nM de Leptomycin B (LMB) diluida en etanol al 70% (inhibidor específico de la exportina CRM1) y con el vehículo solamente. Enseguida las preparaciones se sometieron a ensayos de IF indirecta para analizar la distribución de las proteínas STAT 3, B23 o ZO-2. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Se muestran imágenes representativas de microscopía confocal de 3 experimentos independientes con cortes ópticos a nivel del núcleo. El tratamiento con LMB restauró los niveles nucleares de las proteínas analizadas en los fibroblastos HGPS.

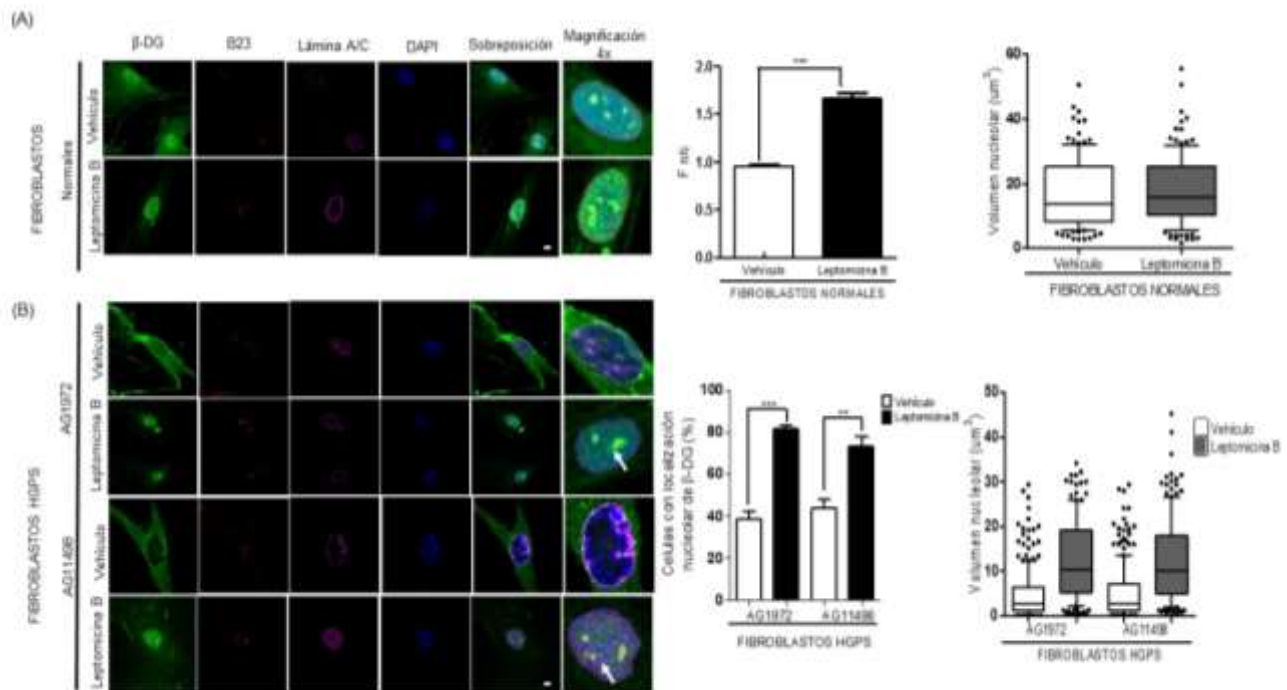


Figura 14. El tratamiento con el inhibidor de la exportación nuclear LMB restaura la localización nuclear/nucleolar del β -DG y aminora el estrés nucleolar en los fibroblastos HGPS. (A y B) Los cultivos de fibroblastos primarios normales y HGPS se sembraron sobre cubreobjetos y se trataron durante 6 días con 50 nM de Leptomycin B (LMB) diluida en DMSO, inhibidor específico de la exportina CRM1, y con el vehículo solamente. Enseguida las preparaciones se sometieron a ensayos de IF indirecta triple para analizar la distribución de las proteínas β -DG, B23 y lámina A/C, y los núcleos se contra-tiñeron con DAPI. Se muestran imágenes representativas de microscopía confocal de 3 experimentos independientes con cortes ópticos a nivel del núcleo. Se cuantificó la intensidad de la fluorescencia presente en citoplasma y núcleo de los fibroblastos normales mediante el programa ImageJ, y se obtuvo el cociente Fn/c de las células tratadas con LMB o sólo con el vehículo (Fig. 5A; panel central, los asteriscos indican diferencias significativas entre los cultivos). Se analizaron 200 células y se cuantificó el número de células con tinción nucleolar del β -DG presente en cada cultivo y las diferencias estadísticamente significativas se señalan con asteriscos (Fig. 5B panel central). Se calculó el volumen de los nucléolos de 200 células de cada cultivo mediante el programa Image J (Fig. A y B; paneles de la extrema derecha, los asteriscos indican diferencias significativas).

Es importante resaltar la importancia que tiene el alivio del estrés nucleolar en el HGPS, ya que como se mencionó anteriormente esta alteración conduce a la senescencia celular. Por lo tanto, es factible sugerir que al normalizar la exportación nuclear exacerbada y aminorar el estrés nucleolar se está obteniendo un efecto anti-senescente sobre las células HGPS.

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a que el tratamiento con la LMB alivia el estrés nucleolar de las células HGPS mediante la normalización de la exportación nuclear mediada por CRM1, consideramos relevante analizar si este tratamiento tiene un efecto global anti-senescente en el HGPS.

4. HIPÓTESIS

La corrección de la exportación nuclear mediada por CRM1 tiene un efecto anti-senescente en las células HGPS.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL:

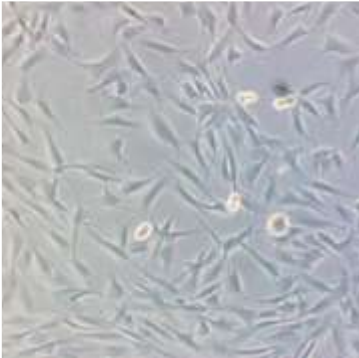
- Analizar el efecto anti-senescente del tratamiento con la LMB en fibroblastos de pacientes con Progeria.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

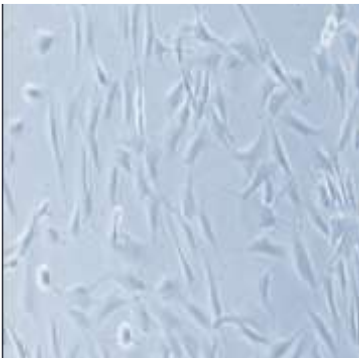
1. Caracterizar el modelo celular.
2. Efecto del tratamiento con LMB sobre el fenotipo senescente de los fibroblastos HGPS:
 - a) Porcentaje de células positivas para la actividad de la enzima SA- β gal.
 - b) Niveles proteicos de la lámina B1.
 - c) Morfología celular senescente.

6. MODELO DE ESTUDIO

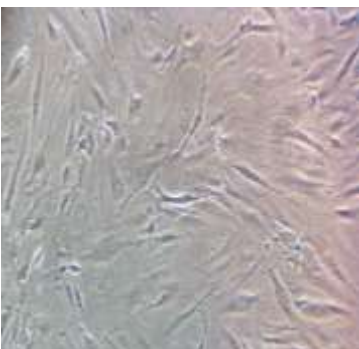
Células AG08469: Fibroblastos humanos de tejido de piel provenientes del padre (caucásico) clínicamente no afectado de un niño afectado.



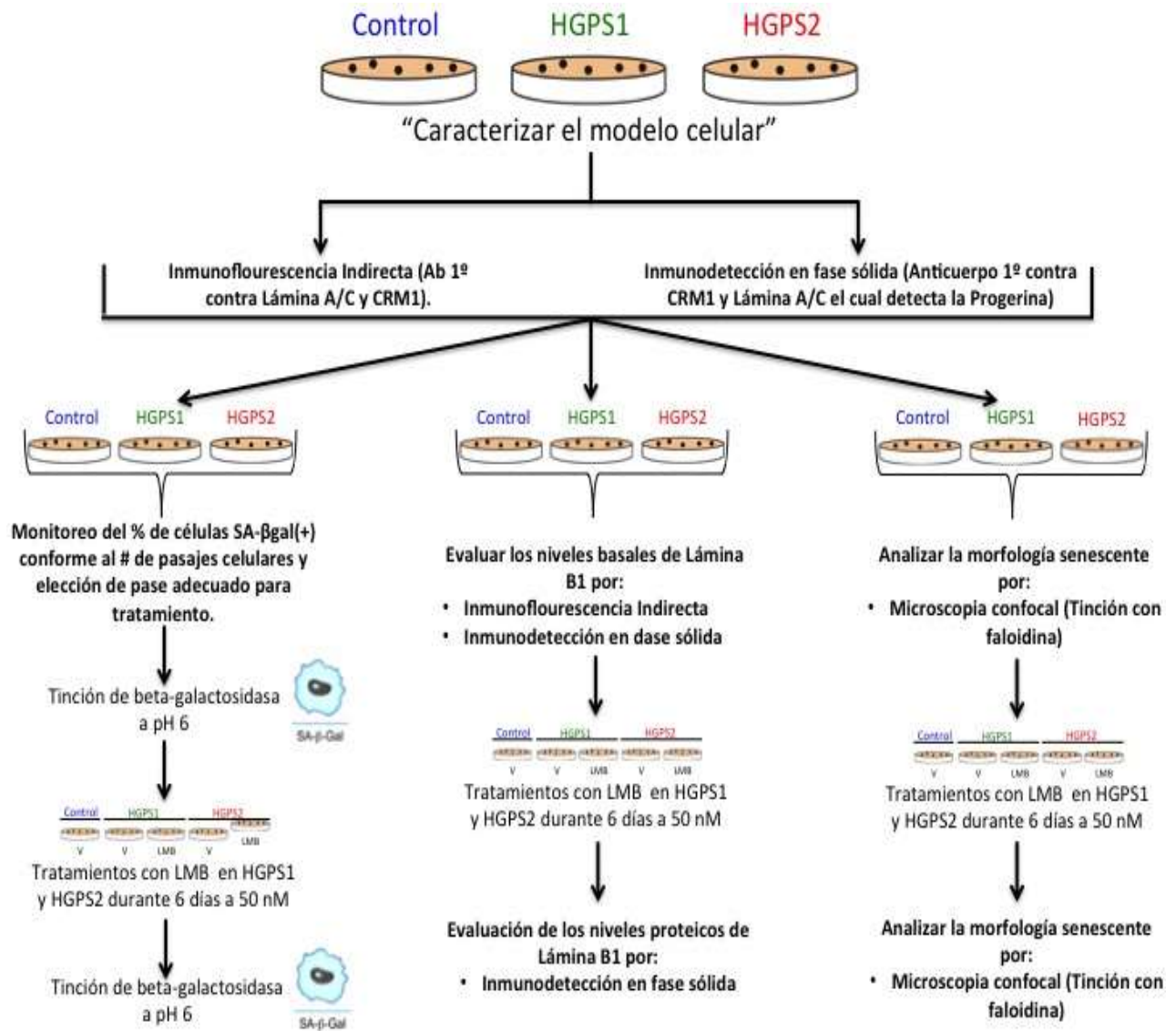
Células AG11513: Fibroblastos humanos de tejido de piel provenientes de un paciente de sexo femenino caucásica, de 8 años de edad (al tomar la muestra) con el HGPS.



Células AG11498: Fibroblastos humanos de tejido de piel de un paciente de sexo masculino, de 14 años de edad (al tomar la muestra) con el HGPS; que presentaba además daño cardiovascular.



7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 CULTIVO CELULAR

Se utilizaron fibroblastos de dos pacientes con el HGPS (AG11513 y AG11498, Coriell Cell Repository) con la mutación *LMNA* G608G y como control del estudio se emplearon fibroblastos de una persona sana (AG08469 Coriell Cell Repository). Los cultivos celulares se mantuvieron en medio esencial mínimo (MEM) suplementado con aminoácidos esenciales y aminoácidos no esenciales, 10% de suero fetal bovino inactivado por calor y 50 U/ml de penicilina y estreptomina. Las células se cultivaron a 37°C en 5% de CO₂. Cuando se indica, los cultivos de fibroblastos primarios se trataron por 7 días con 10µM del inhibidor de la enzima farnesil transferasa (FTasa), FTI-277 (Sigma-Aldrich), diluido en DMSO, o por 6 días con 50 nM de Leptomycin B (LMB; Sigma-Aldrich) diluida en etanol al 70%. Los cultivos controles se les brindó tratamiento con el vehículo solamente.

8.2 INMUNOFLUORESCENCIA ACOPLADO y MICROSCOPIO CONFOCAL

Las células se sembraron sobre cubreobjetos en cajas de 35mm y se incubaron toda la noche a 37°C en una atmósfera con CO₂ al 5%. Al día siguiente se removió el medio y las células se lavaron con 2ml de PBS. Enseguida se fijaron con 4% de paraformaldehído durante 10 min y se permeabilizaron con Tritón X-100-PBS al 0.2% durante 10-15 min. Posteriormente se realizó un bloqueo adicionando gelatina al 0.5% y suero fetal bovino al 1% en PBS durante 30 minutos. Las células se incubaron durante la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente. Al día siguiente, las células se lavaron con PBS y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente. Transcurrido ese tiempo, las preparaciones se lavaron con PBS y los núcleos se contratiñeron con DAPI (1:600) durante 7 minutos a temperatura ambiente. Las preparaciones se lavaron con PBS y agua MilliQ, se dejaron secar y posteriormente se montaron en portaobjetos con 6µl de VectaShield (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, EE.UU.). Las preparaciones se examinaron en un microscopio de escaneo de láser confocal (SP8 Leica, Heidelberg, Alemania) utilizando el objetivo de inmersión en aceite.

8.3 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

Los cultivos celulares se sembraron sobre cajas Petri de 35 mm a una confluencia de 70-80%, se sometieron a dos lavados con 2 ml de PBS y se mantuvieron posteriormente en hielo. Se adicionó 25 μ l de la solución amortiguadora de lisis (50 mM Tris-HCl pH8; 150mM NaCl; 1mM PMSF, 1% Tritón, 1x complete;) y las células se cosecharon con la ayuda de un gendarme. Para terminar la lisis celular, la suspensión se sometió a vortex durante 10s cada dos minutos durante media hora. Para la eliminación de los restos celulares, la suspensión se centrifugó a 10000 r.p.m durante 3 minutos y se recuperó el sobrenadante (extracto de proteínas totales).

8.4 INMUNODETECCION EN FASE SOLIDA

Los extractos de proteína totales se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, utilizando la solución amortiguadora de transferencia (Tris-Glicina 1X-Metanol 20%). La transferencia se realizó en una cámara semi-húmeda a 20V durante 1h. La membrana se bloqueó durante 1 h a temperatura ambiente con 5% de leche en polvo baja en grasa en la solución amortiguadora Tris-Buffered- Salino-Tween-20 (TBS-T) 1X para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo primario. Posteriormente se incubó en agitación constante durante toda la noche a 4° C con el anticuerpo primario de interés diluido en TBS-T 1X. Se lavó el anticuerpo primario por lavados repetidos con el mismo buffer y posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario por 1hr a temperatura ambiente con agitación constante. Las proteínas específicas se revelaron utilizando el reactivo de quimioluminiscencia (ECL) y la exposición posterior de la membrana en una placa fotográfica.

8.6 ANTICUERPOS

Para los ensayos de inmunofluorescencia se emplearon los siguientes anticuerpos: anticuerpo monoclonal de ratón anti-lamina A/C (1:250) (ab8984; Abcam); Para la

inmunodetección en fase sólida se usó un anticuerpo policlonal de conejo anti-lámina A/C (sc-20681; Santa Cruz, CA, EE.UU.), un anticuerpo policlonal de conejo anti-lámina B1 (ab16048; Abcam); un anticuerpo policlonal de conejo anti-Calnexina (1:500) (sc-11397; Santa Cruz, CA, EE.UU), un anticuerpo policlonal de conejo anti-CRM1 (Novus Biologicals).

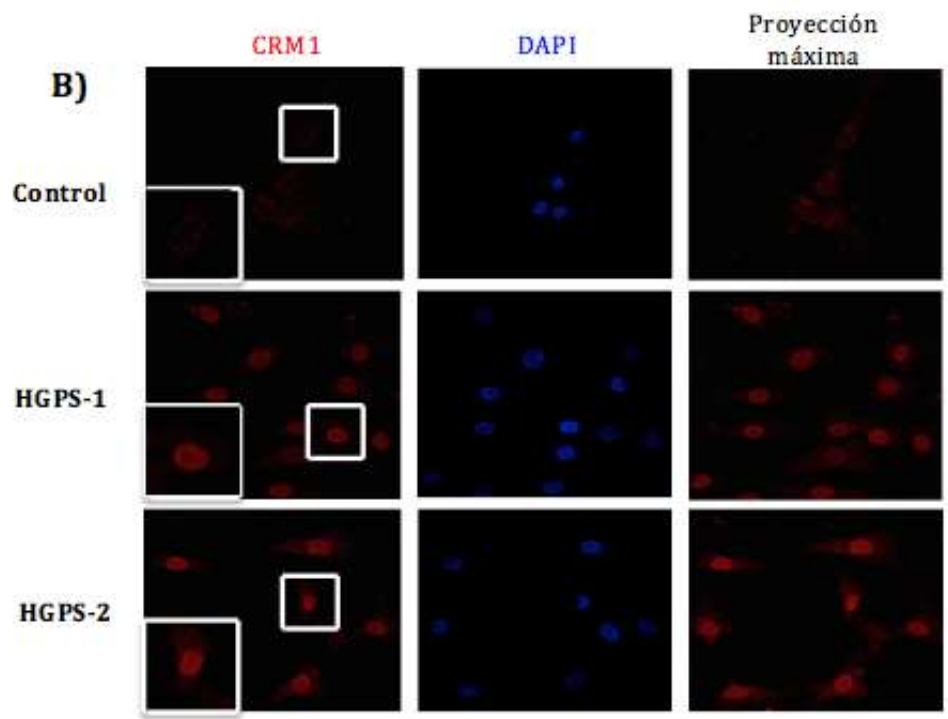
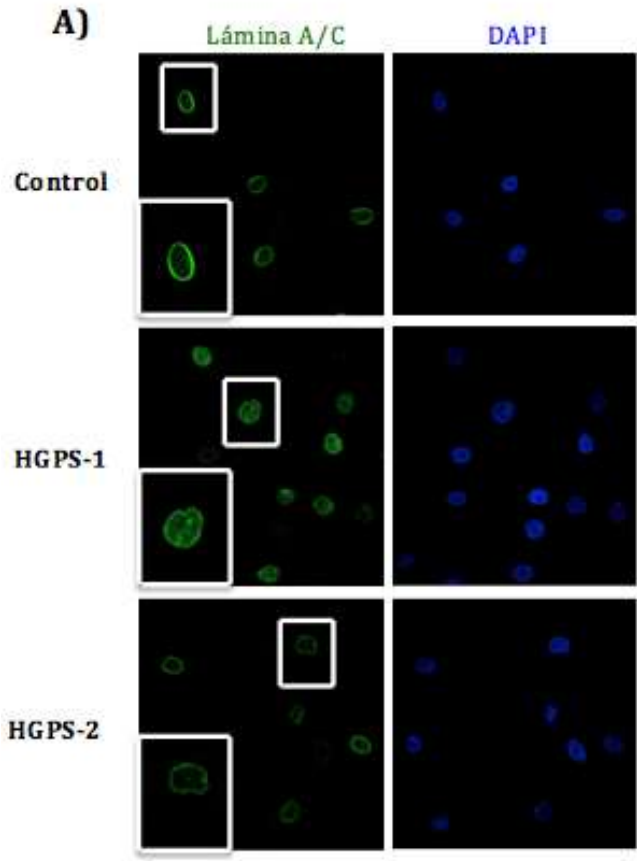
8.7 CITOQUÍMICA DE LAS CÉLULAS SENESCENTES

Los fibroblastos HGPS y del grupo control se sembraron sobre cubreobjetos de 18x18 mm contenidos en cajas petri de 35 mm y se les adiciono 1.5 ml de medio de cultivo. Las células se incubaron por 24 horas y en seguida se lavaron una vez con 2 ml de la solución amortiguadora de Fosfato Salino (PBS) 1X. Se adicionó 1ml de solución fijadora 1X (2% de formaldehído, 0.2% de glutaraldehído en PBS, SIGMA) durante 7 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se lavaron las células dos veces con 3 ml de PBS 1X. Se adicionó a las preparaciones 1ml de la solución de tinción de β -Galactosidasa (1mg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-inolil- β -D-Galactospiranosido (X-gal) en dimetilformamida (20 mg/ml stock); 40 mM ácido cítrico / fosfato de sodio a pH 6.0; 150 mM NaCl; 2 mM MgCl₂; 5mM ferricianuro potásico, SIGMA) y se incubaron a 37°C toda la noche en una incubadora seca sin CO₂. Las preparaciones se lavaron con PBS, se dejaron secar y posteriormente se montaron en un portaobjetos con 6 μ l de VectaShield (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, EE.UU.) Se observaron las células bajo microscopía de campo claro y se cuantificaron las células teñidas de azul que expresan la β -Galactosidasa (células senescentes).

9. RESULTADOS

9.1 Caracterización de los fibroblastos de individuos con Progeria

Con la finalidad de caracterizar los fibroblastos de individuos con HGPS se analizó la morfología nuclear y la expresión de Progerina, marcas distintivas de las células HGPS. Mediante inmunofluorescencia indirecta empleando un anticuerpo dirigido contra la lámina A/C observamos que los fibroblastos HGPS presentan una morfología nuclear aberrante, caracterizada por la pérdida de la forma ovalada del núcleo y la presencia de pliegues y pequeñas ampollas, en comparación con los fibroblastos provenientes de un individuo sano (control) (Fig. 15A). De manera consistente, por medio de una inmunodetección en fase sólida empleando un anticuerpo dirigido contra la lámina A/C se detectó la presencia de las láminas A (70 kDa) y C (62 kDa) en los extractos totales de los fibroblastos control, mientras que en los fibroblastos HGPS se observó una banda adicional de aproximadamente 65 kDa que corresponde a la Progerina. Así mismo, empleando un anticuerpo primario dirigido contra CRM1 observamos una mayor intensidad de fluorescencia en los fibroblastos HGPS (Fig. 15B) y un incremento en la banda que corresponde a CRM1 en los fibroblastos HGPS, mediante ensayos de IF e inmunodetección en fase sólida respectivamente (Fig. 15C).



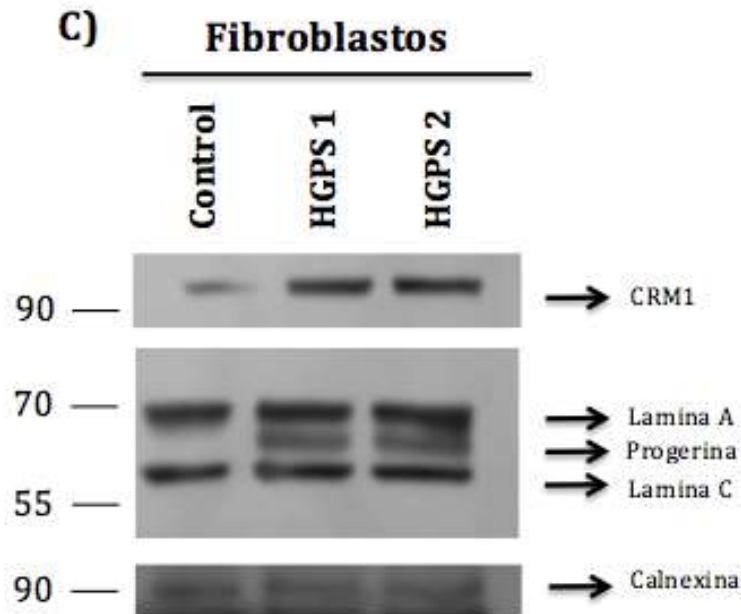
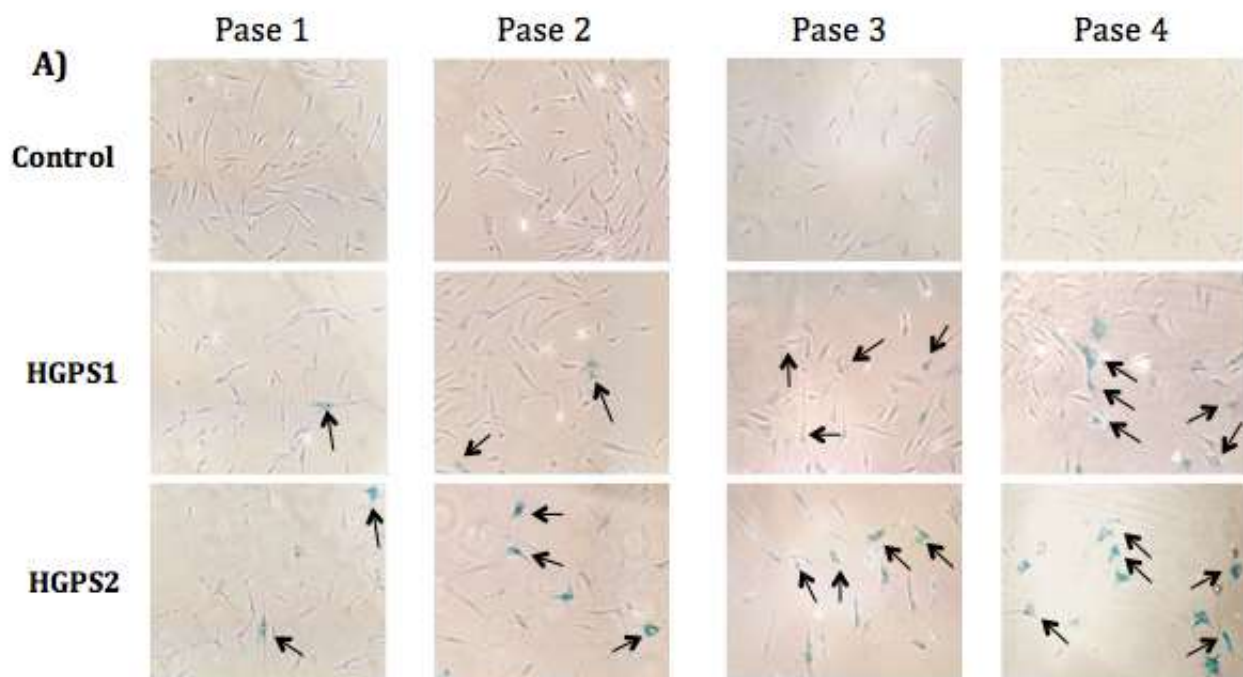


Figura 15. Distribución y expresión de la lámina A/C, Progerina y CRM1 en los fibroblastos control y HGPS. (A) Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta empleando un anticuerpo dirigido contra la lámina A/C /Progerina (verde). Los núcleos se contra-tiñeron con DAPI (azul). (B) Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta empleando un anticuerpo dirigido contra CRM1 (rojo). Los núcleos se contra-tiñeron con DAPI (azul). (C). Se realizaron ensayos de inmunodetección en fase sólida empleando extractos totales de fibroblastos control y HGPS y anticuerpos primarios dirigidos contra la lámina A/C/Progerina y CRM1.

9.2 El porcentaje de células senescentes (positivas para la tinción SA-βgal) aumenta conforma avanza el número de pasajes de los fibroblastos HGPS

Se ha reportado que conforme aumenta el número de pasajes de cultivos primarios de fibroblastos, aumenta también la expresión de Progerina, lo que a su vez induce senescencia celular prematura y daño celular generalizada (Cao K. et al., 2011). Por lo tanto, decidimos monitorear el porcentaje de células senescentes a través de los pasajes de los fibroblastos HGPS y elegir el pasaje adecuado para estudios posteriores, en donde ya esté presente la senescencia celular pero no haya un daño celular importante.

Las células senescentes presentan actividad de la enzima β -galactosidasa que se relaciona con una alta actividad lisosomal y se ha utilizado como un biomarcador de senescencia. Por lo tanto, contamos el porcentaje de células SA- β gal (+) conforme al número de pasajes de los fibroblastos HGPS. Cuando se proporciona el sustrato de la enzima β -galactosidasa, X-Gal a los cultivos celulares se genera una tinción azul en las células senescentes, la cual se observa bajo microscopia de luz. Se encontró que en el pasaje # 2 los cultivos HGPS1 y HGPS2 presentan un porcentaje de 45% de células SA- β gal (+) mientras que las células control tiene solamente 2% de células senescentes. En el pasaje # 3 el porcentaje de fibroblastos senescentes fue del 50% y 100% para los cultivos HGPS1 y HGPS2 respectivamente, mientras que las células control alcanzaron un 5% (Fig. 16A y B). Con base en estos resultados los estudios posteriores se realizaron en el pase # 2.



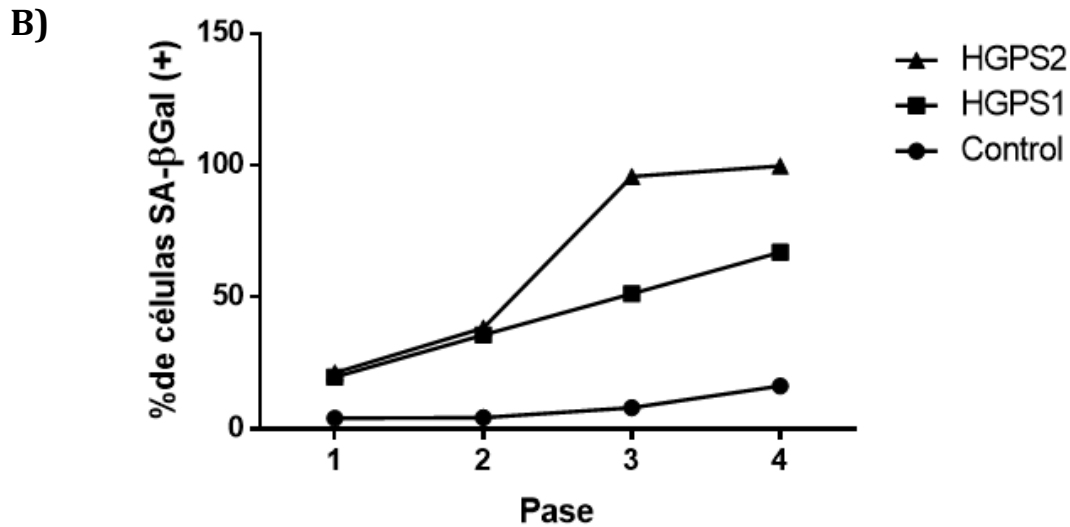


Figura 16. Monitoreo de células SA-βgal (+) en los fibroblastos HGPS conforme el número de pasajes. (A). Los fibroblastos control y HGPS se sembraron en cubreobjetos contenidos en cajas de 35 mm (p35). Se llevó a cabo la tinción para la enzima β-galactosidasa (SA-βgal) asociada a senescencia celular mediante citoquímica. Las células teñidas de azul que expresan la β-galactosidasa se identificaron por microscopia de luz utilizando campo claro 20X. (B). Se graficó el porcentaje de células SA-βgal (+) conforme al número de pasajes de los fibroblastos control y HGPS; n= 300 células.

9.3 El tratamiento con LMB (inhibidor de la exportina CRM1) disminuyó el porcentaje de células senescentes en los fibroblastos con el HGPS

Con la finalidad de evaluar el potencial efecto anti-senescente de la Leptomicina B (LMB), la cual normaliza la exportación nuclear de los fibroblastos con el HGPS, se procedió a evaluar el porcentaje de células senescentes mediante la detección del biomarcador de senescencia SA-βgal. Los fibroblastos primarios control y HGPS del pasaje # 2 se cultivaron sobre cubreobjetos y se trataron durante 6 días con 50 nM de LMB diluida en etanol al 70% o con el vehículo solamente, antes de evaluarse la actividad de la enzima β-galactosidasa. De manera interesante, encontramos una disminución del 50% de células senescentes (SA-βgal [+]) en los fibroblastos HGPS1 tratados con LMB, con respecto al cultivo HGPS1 tratado solo con el vehículo. Sin embargo, la LMB no tuvo efecto alguno sobre el porcentaje de células

senescentes en los fibroblastos HGPS2. Es importante mencionar que el tratamiento con LMB provocó la aparición de un 80% de células senescentes, lo que indica que la LMB genera algún tipo de estrés celular (Fig. 17A y B).

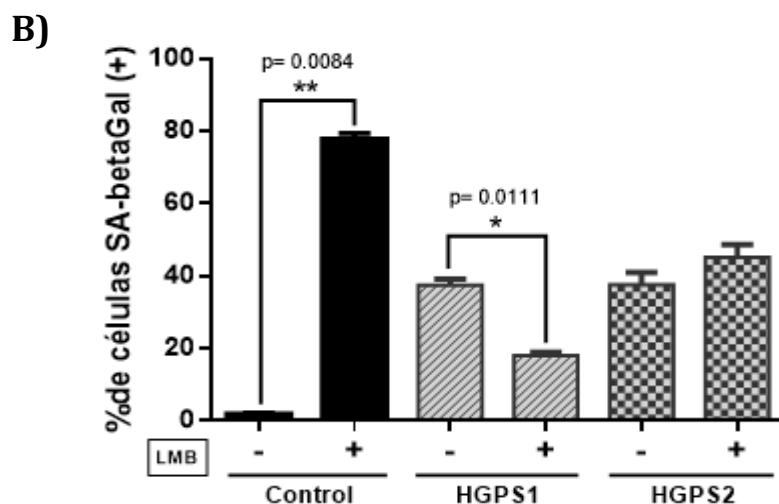
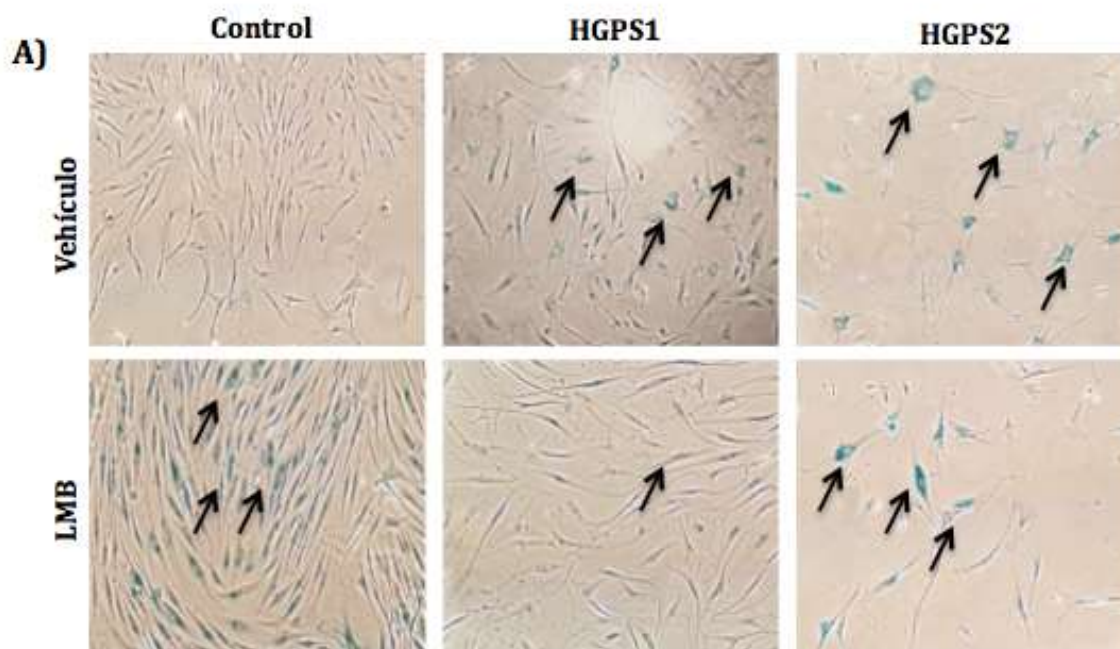


Figura 17. La normalización de la exportación nuclear de proteínas mediante tratamiento con LMB disminuyó el porcentaje de células SA-βgal (+) en los fibroblastos HGPS1. (A) Los fibroblastos control y HGPS se cultivaron sobre cubreobjetos en cajas de 35 mm y se trataron durante 6 días con 50 nM de Leptomicina B (LMB) diluida en etanol al 70% o con el vehículo solamente. Posteriormente se llevó a cabo la detección de la actividad de la enzima β-galactosidasa mediante citoquímica. Las células teñidas de azul que expresan la β-galactosidasa se identificaron por microscopia de luz utilizando campo claro 20X. (B). Se graficó el porcentaje de células SA-βgal (+); n= 300 células.

9.4 La inhibición de la farnesilación de la Progerina no disminuye el porcentaje de células senescentes en los fibroblastos HGPS.

Se ha demostrado que la Progerina actúa como dominante negativa sobre la lámina A/C debido a que permanece anormalmente farnesilada. La Progerina es el origen bioquímico de la batería de alteraciones celulares presentes en el HGPS, por lo que se ha propuesto el uso de fármacos que inhiben la farnesilación de la Progerina para tratar este padecimiento. Se ha demostrado que el tratamiento con un inhibidor de la farnesil-transferasa (FTI-277) alivia la morfología nuclear aberrante del HGPS (Capell B. C. et al., 2005); no obstante, este tratamiento no logra corregir otros fenotipos de gran importancia en el HGPS, como el daño al DNA (Liu Y. et al 2006). Por lo tanto, decidimos averiguar si el tratamiento con FTI-277 alivia la senescencia celular del HGPS. En primer lugar, evaluamos si el FTI-277 restaura la morfología nuclear normal, como está reportado previamente (Capell B. C. et al., 2005). Los fibroblastos control y HGPS de pasaje # 2 se cultivaron en cubreobjetos y se trataron durante 7 días con 10 μ M del FTI-277 diluido en DMSO o con el vehículo solamente. Se analizó la distribución de la lámina A/C/Progerina mediante inmunofluorescencia indirecta empleando un anticuerpo específico dirigido contra la lámina A/C. Se observó un 80% y 82% de células con morfología nuclear aberrante en los cultivos HGPS1 y HGPS2 respectivamente y de acuerdo a lo esperado, el tratamiento con FTI-277 disminuyó considerablemente el porcentaje de células con núcleos deformes en los cultivos HGPS1 (23%) y HGPS2 (30%), lo que demuestra la efectividad del tratamiento. (Fig. 18A y B).

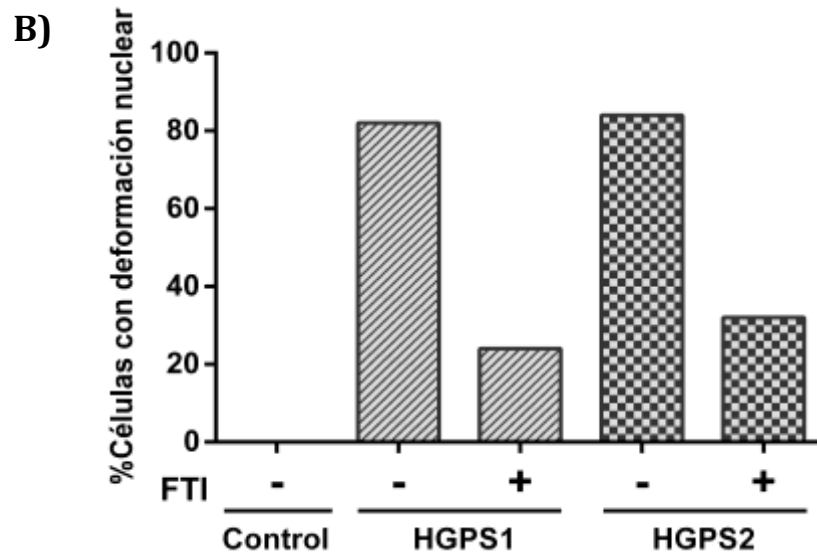
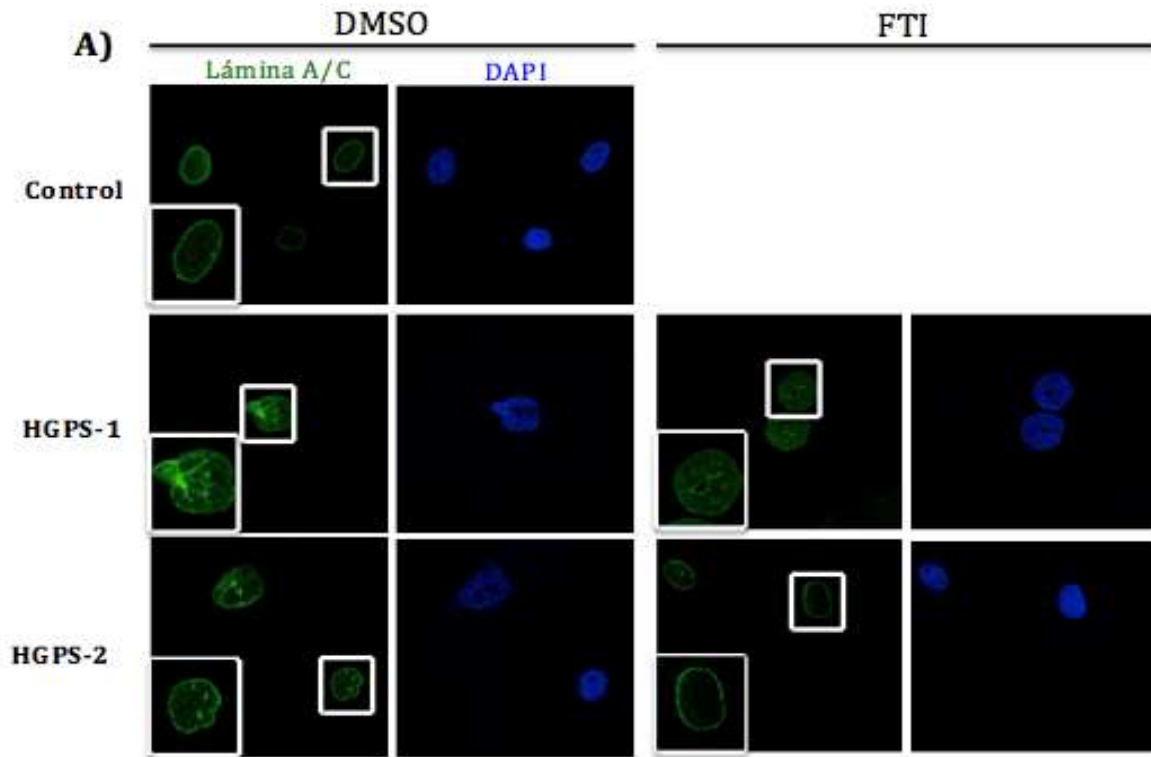
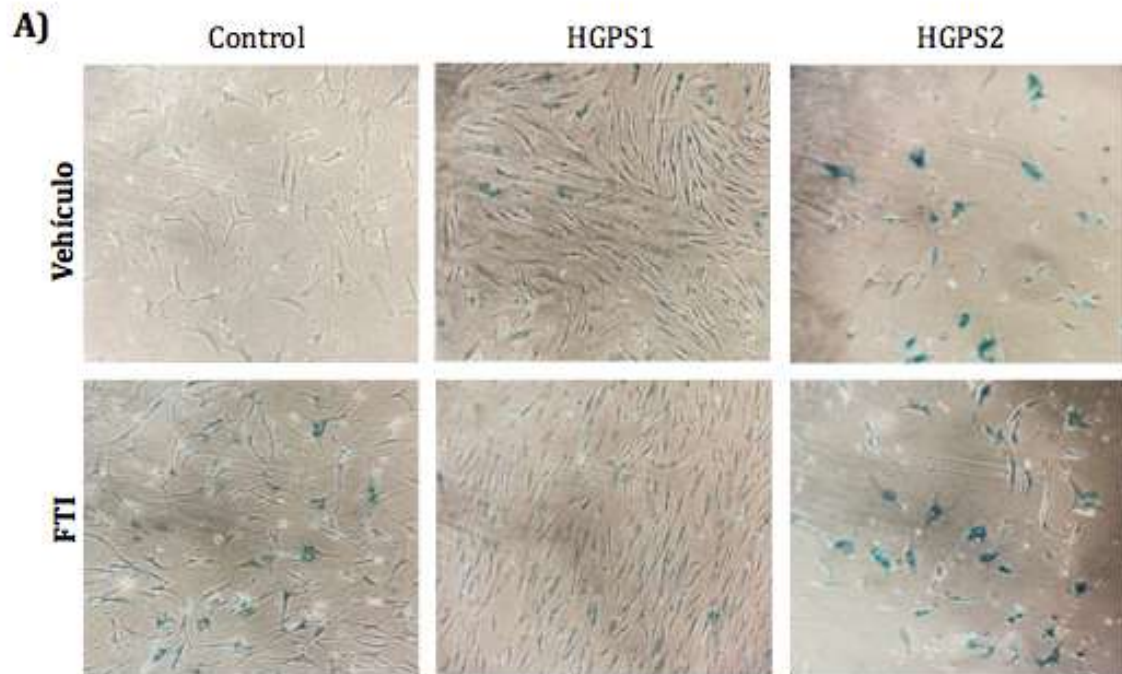


Figura 18. El fármaco FTI-227 alivió la morfología nuclear aberrante de los fibroblastos HGPS. (A) Los fibroblastos control y HGPS del pasaje # 2 se cultivaron sobre cubreobjetos y se trataron durante 7 días con 10 μ M del FTI-277 diluido en DMSO o con el vehículo solamente. La distribución de la lámina A/C/Progerina (Verde) se analizó mediante microscopia confocal. Los núcleos se contra-tiñeron con DAPI (azul). Se graficó el porcentaje de células con morfología nuclear aberrante de los fibroblastos control y HGPS.

Posteriormente se llevó a cabo la detección de la actividad de β -galactosidasa y se observó que el porcentaje de células SA- β gal (+) se mantuvo cercano al 50% en los fibroblastos HGPS tratados con FTI o con el vehículo solamente. Lo que indica que la inhibición de la farnesilación de la Progerina no alivia el fenotipo senescente de los fibroblastos HGPS.



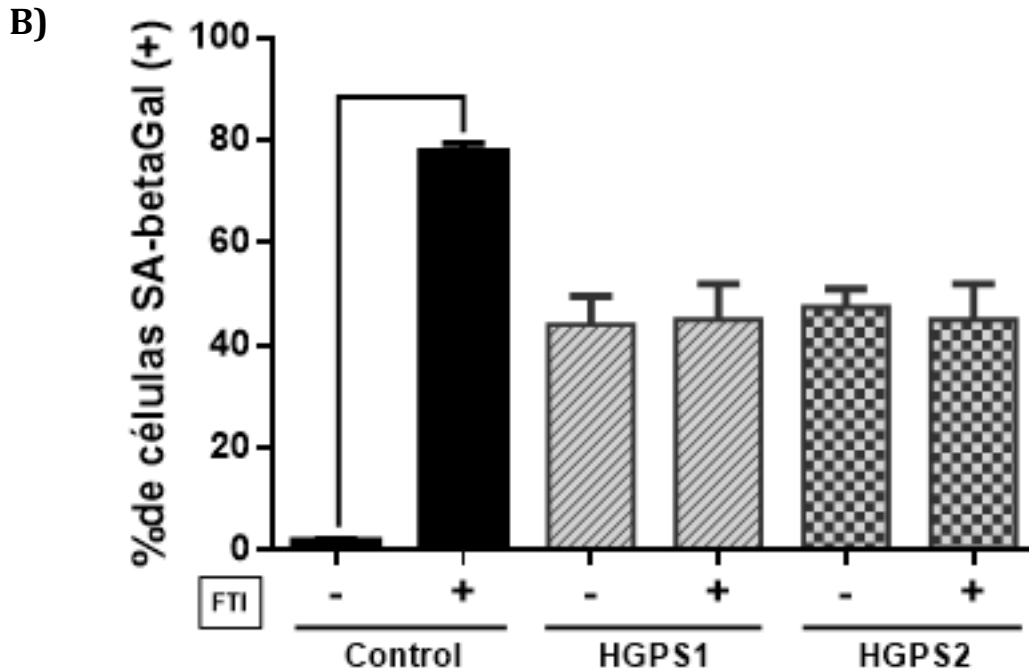
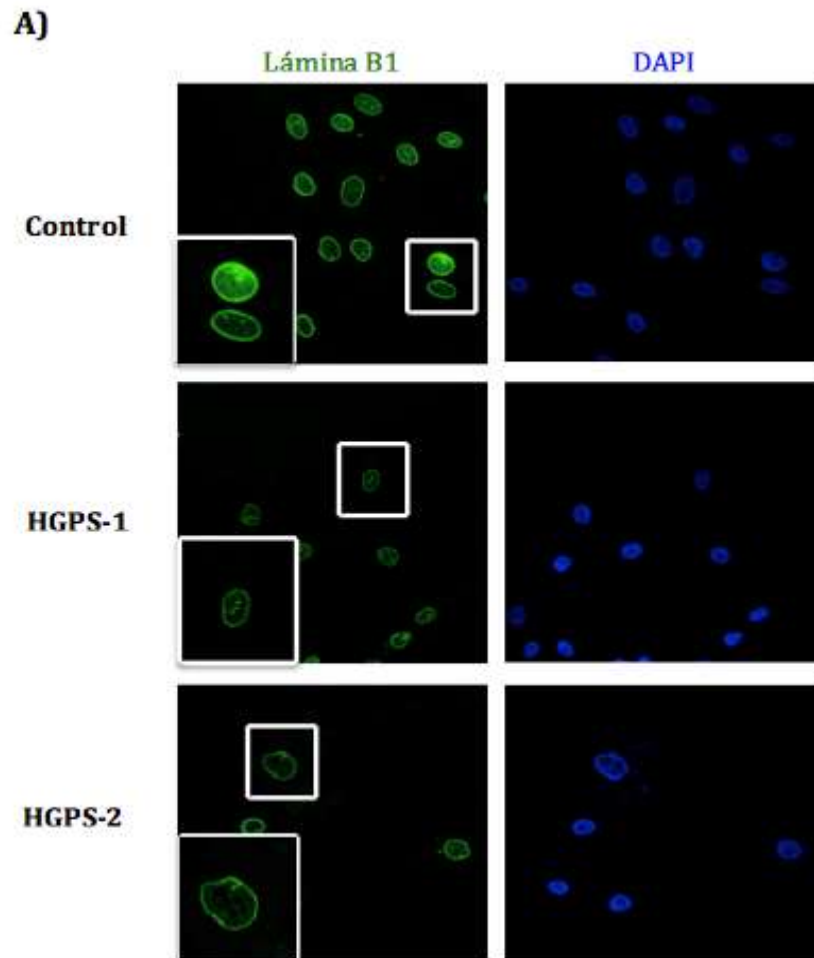


Figura 19. La Inhibición de la farnesilación de la Progerina no disminuye el porcentaje de células senescentes en los fibroblastos HGPS. (A) Los fibroblastos control y HGPS se cultivaron sobre cubreobjetos en cajas de 35 mm y se trataron durante 7 días con 10 μ M de FTI-277 diluido en DMSO o con el vehículo solamente. Posteriormente se llevó a cabo la detección de la actividad de la enzima β -galactosidasa mediante citoquímica. Las células teñidas de azul que expresan la β -galactosidasa se identificaron por microscopía de luz utilizando el campo claro, 20X. (B). Se graficó el porcentaje de células SA- β gal (+); n= 300 células.

9.5 Disminución de la Lámina B1 en fibroblastos con el HGPS.

Previamente se ha reportado una disminución en los niveles proteicos de la lámina B1 en las células HGPS; la lámina B1 es una molécula central en diversos procesos celulares y la pérdida de su función es un paso necesario para el establecimiento de la senescencia celular. Tomando en consideración el efecto anti-senescente de la LMB que observamos previamente, decidimos evaluar si este tratamiento tiene un efecto sobre los niveles proteicos de la lámina B1. Como un primer paso evaluamos los niveles basales de la lámina B1 en los fibroblastos control y HGPS por medio de inmunofluorescencia indirecta e inmunodetección en fase sólida, empleando un anticuerpo anti-lamina B1. Observamos una disminución en la

intensidad de fluorescencia de la lámina B1 en los fibroblastos HGPS, en comparación con los fibroblastos control. De manera consistente, se observó una disminución del ~70% en los niveles de la lámina B1 en ambos cultivos de fibroblastos HGPS por medio de inmunodetección en fase sólida (Fig. 21 B y C).



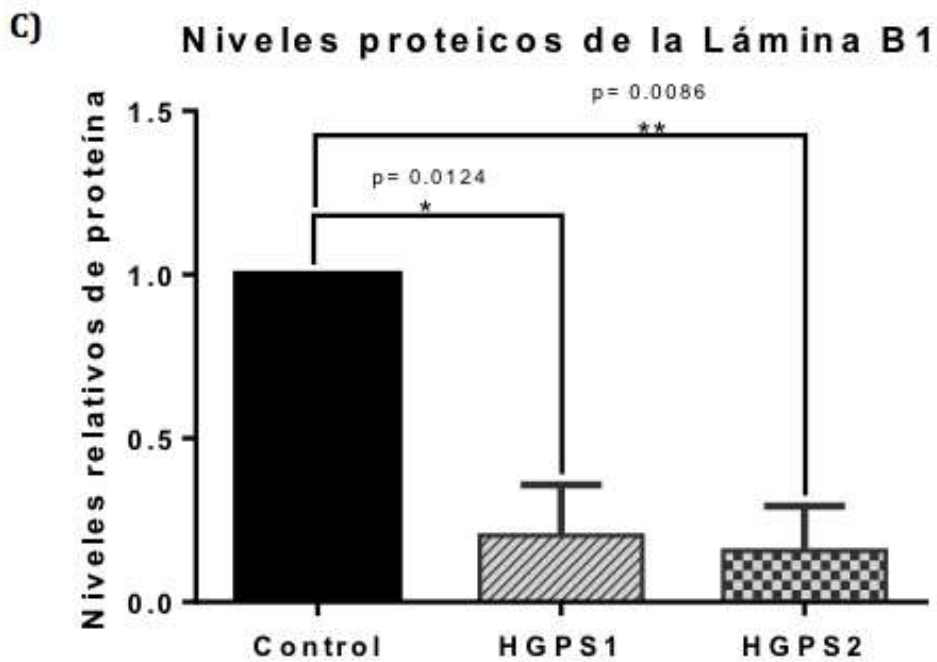
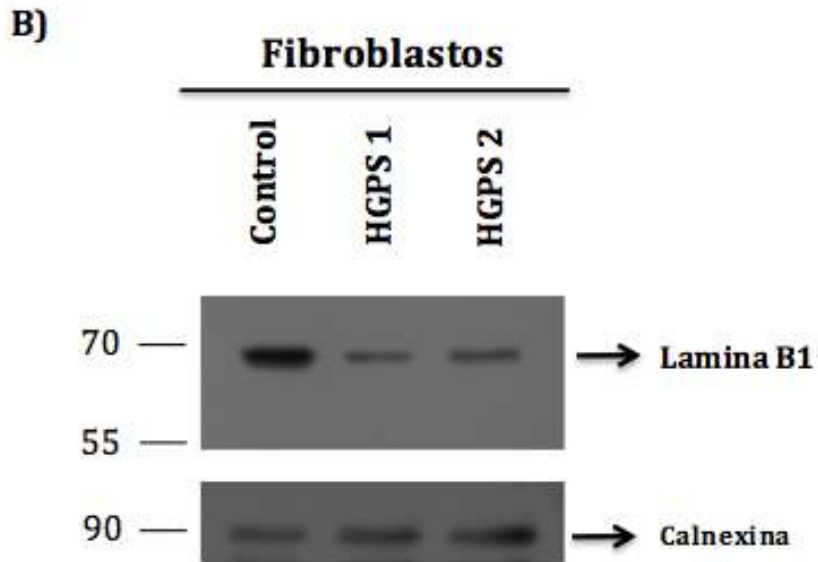
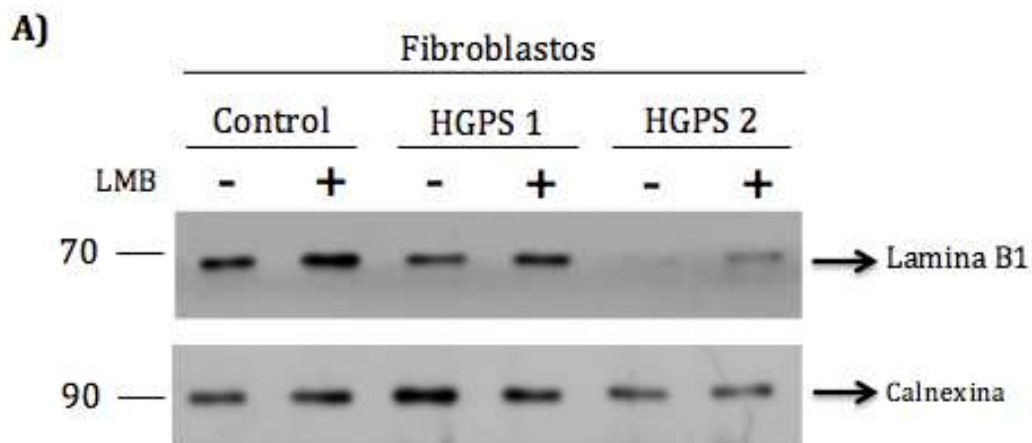


Figura 20. Los niveles de la lámina B1 están disminuidos en los fibroblastos HGPS. (A). Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta empleando un anticuerpo dirigido contra la lámina B1 (verde). Los núcleos se contra-tiñeron con DAPI (azul). (B). La lámina B1 se analizó por inmunodetección en fase sólida a partir de lisados celulares, empleando un anticuerpo dirigido contra la lámina B1; se utilizó Calnexina como control de carga). (C) Se llevó a cabo el análisis de las placas de rayos X por medio de densitometría para cuantificar los niveles de las diferentes proteínas. Los datos corresponden a la media +/- la desviación estándar de tres experimentos independientes.

9.6 El tratamiento con LMB recupera los niveles de la lámina B1 en los fibroblastos HGPS

Decidimos averiguar si el tratamiento con LMB tiene un efecto sobre los niveles disminuidos de la lámina presentes en los fibroblastos HGPS. Para este fin tratamos los cultivos control y HGPS durante 6 días con 50 nM diluida en etanol al 70% o con el vehículo solamente y enseguida se obtuvieron lisados celulares para su análisis posterior por inmunodetección en fase sólida. De manera interesante, se observó una recuperación del 30% en los niveles proteicos de la lámina B1 en ambos cultivos, HGPS1 y HGPS2.



Niveles proteicos de la Lámina B1

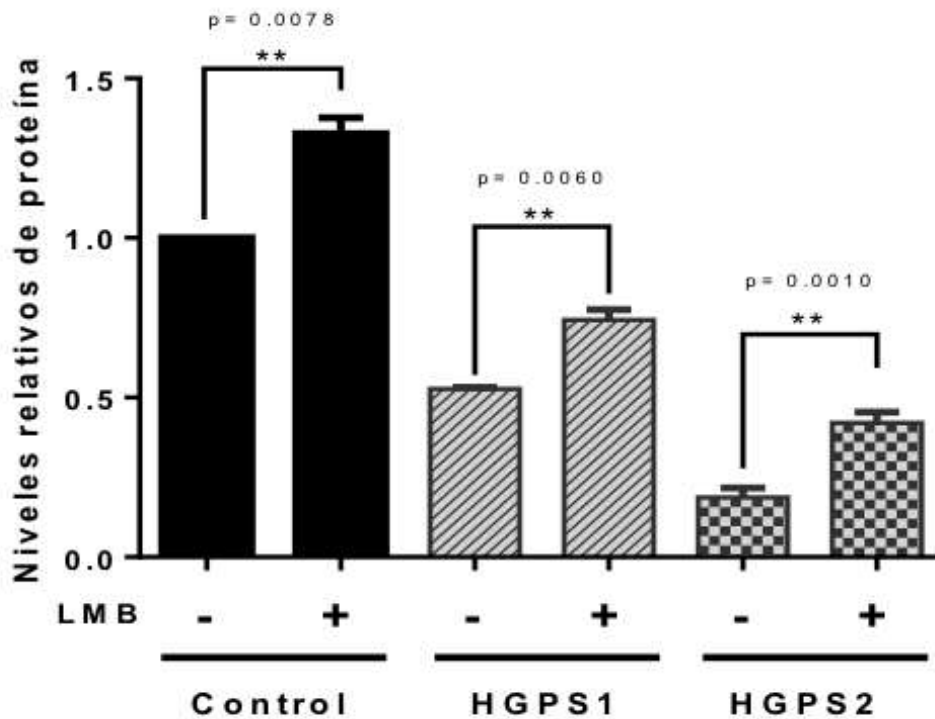


Figura 21. La normalización de la exportación nuclear mediante tratamiento con LMB restauró parcialmente los niveles de la lámina B1 en los fibroblastos HGPS. A) Los fibroblastos control y HGPS se trataron durante 6 días con 50 nM de LMB diluida en etanol al 70% (inhibidor específico de la exportina CRM1) o con el vehículo solamente. Enseguida se obtuvieron lisados celulares que se analizaron mediante inmunodetección en fase sólida empleando un anticuerpo dirigido contra la lámina B1 o contra Calnexina (control de carga). (C) Se llevó a cabo la densitometría de las placas de rayos X para cuantificar los niveles de las diferentes proteínas. Se muestra la media +/- la desviación estándar de tres experimentos independientes.

9.7 Los fibroblastos HGPS presentan una morfología senescente

Se ha reportado que los fibroblastos senescentes presentan una morfología celular extendida (Young, A. R. J. et al., 2013; Sharpless, N. E., & Sherr, C. J. 2015). Con la finalidad de evaluar si los fibroblastos HGPS exhiben la morfología celular característica de la senescencia, las células control y HGPS se tiñeron con Faloidina conjugada con Rodamina para decorar el citoesqueleto de actina. Mediante análisis por microscopía confocal observamos que los fibroblastos controles presenta una morfología de fusiforme, mientras que los fibroblastos HGPS exhiben una morfología aplanada y extendida con una reorganización evidente del citoesqueleto, caracterizada por fibras de actina que cruzan todo el cuerpo celular (Fig. 23).

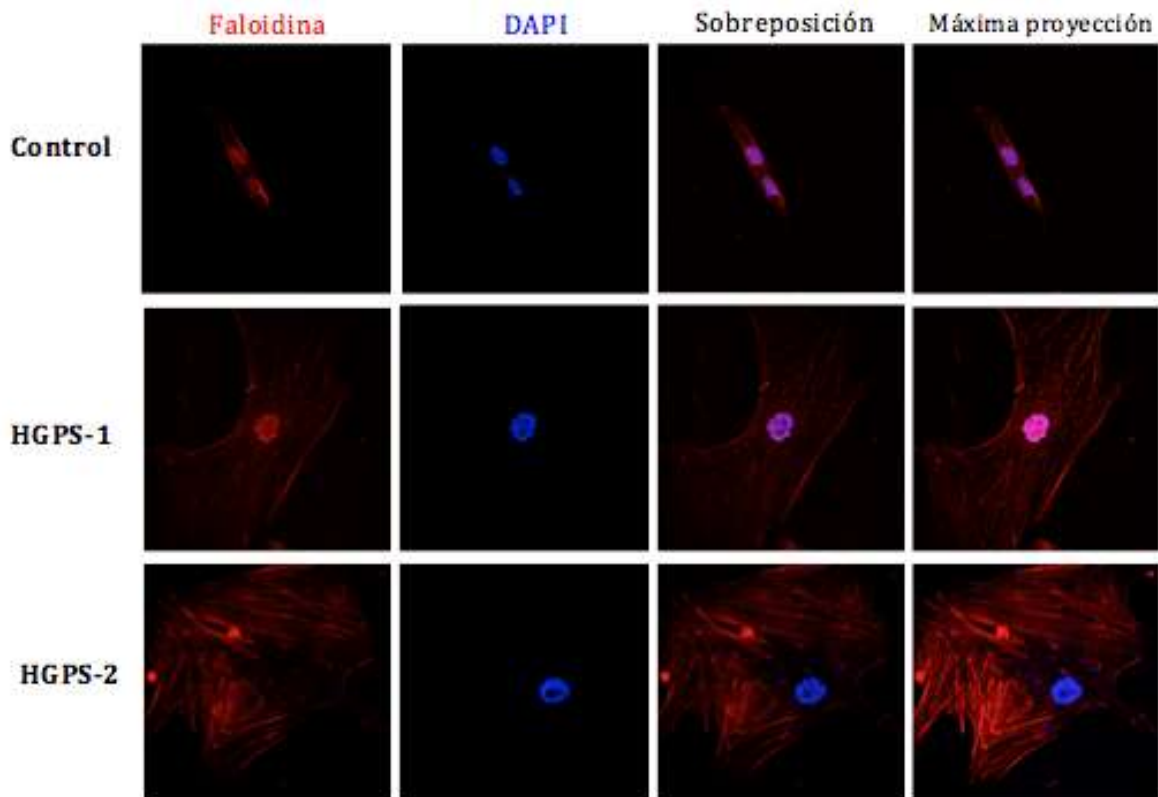


Figura 22. Los fibroblastos HGPS presentan una morfología celular característica de las células senescentes. Los fibroblastos controles y HGPS, cultivados sobre cubreobjetos en cajas de 35 mm, se tiñeron con Faloidina Rodamina (Rojo) para decorar el citoesqueleto de actina. Los núcleos se contra-tiñeron con DAPI (azul).

9.8 El tratamiento con LMB revierte la morfología celular senescente de los fibroblastos HGPS

Procedimos a evaluar si el tratamiento con LMB corrige la morfología celular senescente. Los fibroblastos control y HGPS cultivados sobre cubreobjetos se trataron durante 6 días con 50 nM de LMB diluida en etanol al 70% o con el vehículo solamente y posteriormente se tiñó el citoesqueleto de actina con faloidina para su observación bajo el microscopio confocal. Consistente con un efecto anti-senescente, el tratamiento con LMB restauró la morfología fusiforme en los fibroblastos HGPS, lo que implica que la droga alivia la morfología celular senescente (Fig. 24).

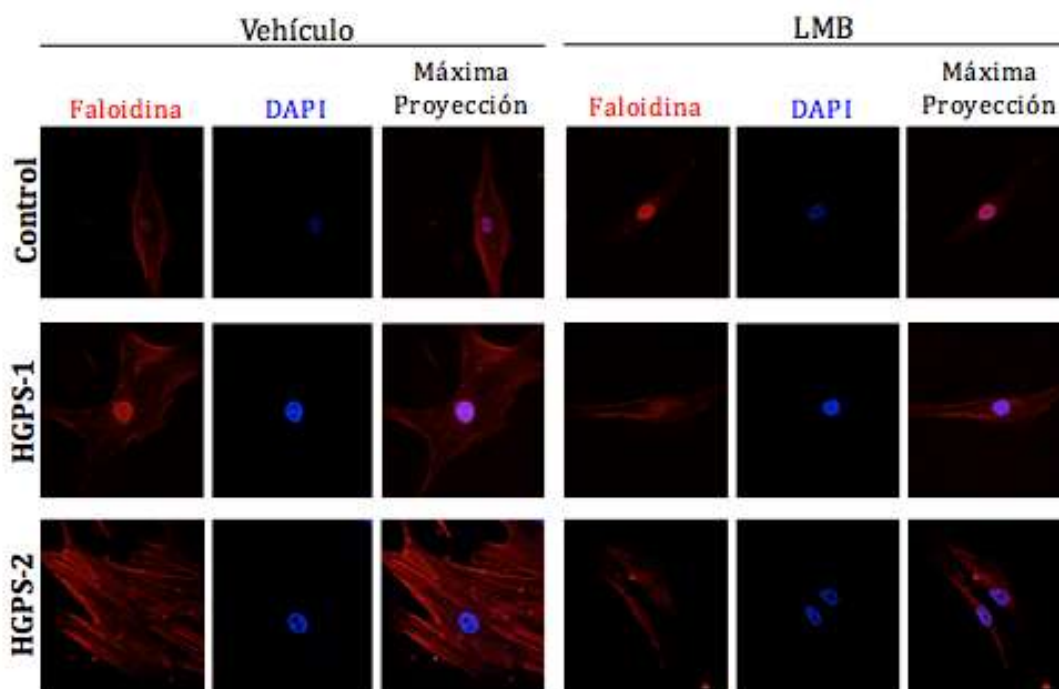
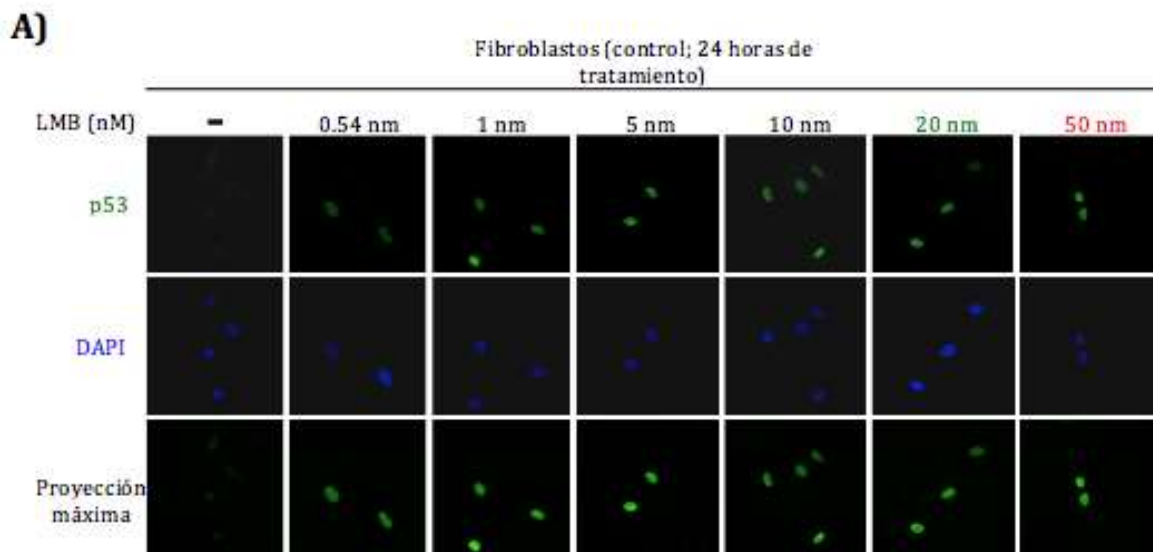


Figura 23. La normalización de la exportación nuclear de proteínas mediante tratamiento con LMB alivia la morfología senescente de los fibroblastos HGPS. (A) Los fibroblastos control y HGPS se cultivaron sobre cubreobjetos en cajas de 35 mm y se trataron durante 6 días con 50 nM de LMB diluida en etanol al 70% (inhibidor específico de la exportina CRM1) o con el vehículo solamente. Se realizó la tinción del citoesqueleto de actina empleando Faloidina Rodamina (rojo) y los núcleos se contrañeron con DAPI (azul).

9.9 Establecimiento de la dosis mínima de LMB que corrige la exportación nuclear de proteínas

Con la finalidad de identificar una concentración mínima efectiva de LMB que disminuya su efecto toxico, tratamos los fibroblastos control y HGPS con diferentes cantidades de LMB (0.54 nM, 1 nM, 5nM, 10 nM, 20 nM y 50 nM) durante 24 horas y 6 días. Para medir la efectividad de los tratamientos analizamos la distribución celular de p53 por medio de microscopia confocal, ya que esta proteína posee una secuencia NES y responde a la LMB (Lindenboim, L., et al., 2011). Se observó una acumulación nuclear de p53 desde las 24 horas de tratamiento con una concentración de 0.54 nM. La acumulación nuclear de p53 a este tiempo fue más notoria con una concentración de LMB de 1 nM. La mayor intensidad de la señal nuclear de p53 se obtuvo a los 6 días de tratamiento con cualquiera de las concentraciones de LMB utilizadas (Fig. 25 A y B).



B)

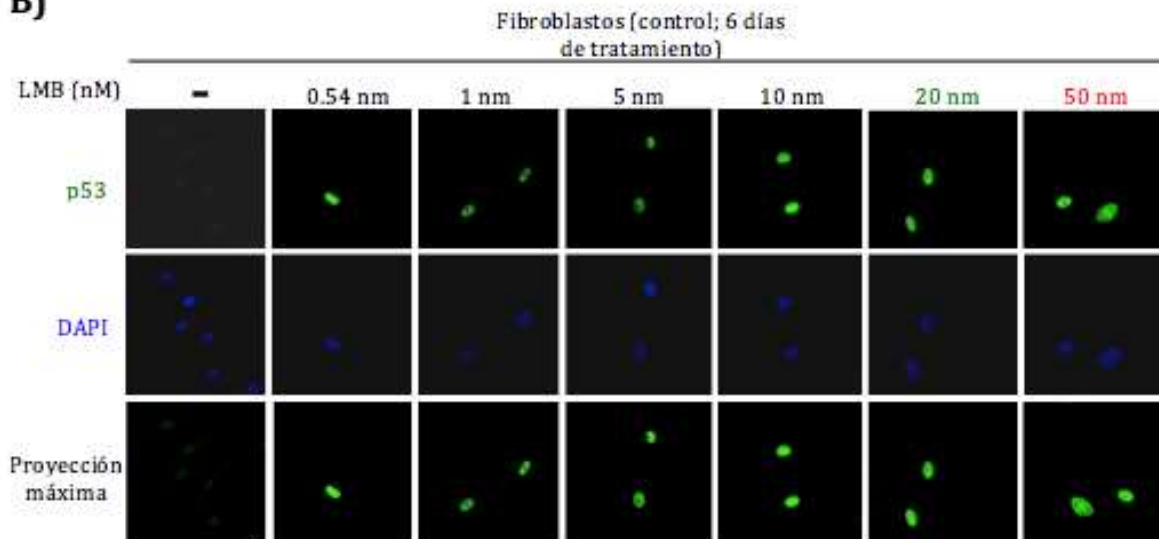


Figura 24. Tiempo y concentración mínima del tratamiento con LMB que genera la acumulación nuclear de p53. Se cultivaron fibroblastos controles sobre cubreobjetos en cajas de 35 mm y se trataron durante 24 horas o 6 días con las diferentes concentraciones de LMB señaladas en la figura. Las células se tiñeron con un anticuerpo primario anti-p53 y los núcleos se contra-tiñeron con DAPI (azul) previo al análisis de las preparaciones por microscopia confocal.

10. DISCUSIÓN

El Síndrome de Progeria Hutchinson-Gilford (HGPS) es una enfermedad compleja que se caracteriza por provocar envejecimiento prematuro. De manera sorprendente el HGPS es causado por una mutación puntual silenciosa en el gen que codifica para la lámina A/C, lo que ocasiona la exposición de un sitio críptico de *splicing* que al entrar en funcionamiento genera una proteína mutante denominada Progerina. La Progerina no madura completamente y a diferencia de la lámina A permanece farnesilada. Debido a que la lámina A es una proteína esencial para la estructura y organización del núcleo, el efecto dominante negativo que ejerce la Progerina sobre ella altera una variedad de procesos celulares importantes. Se han desarrollado sin éxito en la clínica distintas estrategias para eliminar la Progerina o bloquear su función aberrante. Ante este escenario, consideramos que es necesario profundizar en los mecanismos moleculares del HGPS con la finalidad de identificar moléculas dianas para desarrollos terapéuticos emergentes. En nuestro grupo de trabajo hemos revelado que el mecanismo de exportación nuclear de proteínas mediado por la exportina CRM1 se encuentra exacerbado en el HGPS y pensamos que este mecanismo podría ser intermedio entre la presencia de la Progerina y el desarrollo de los distintos fenotipos relacionados con la enfermedad. En apoyo a nuestra hipótesis, hemos demostrado que la normalización del mecanismo de exportación nuclear por medio del uso de inhibidor de la exportina CRM1, la Leptomicina B (LMB), normaliza la localización nuclear de distintas proteínas e importantemente alivia el estrés nucleolar presente en las células HGPS.

En el presente trabajo analizamos si el tratamiento con HGPS alivia la senescencia celular, característica distintiva del HGPS que ha tomado gran relevancia en el estudio del envejecimiento fisiológico y patológico. Tratamos a cultivos de fibroblastos HGPS con LMB y analizamos distintos marcadores asociados con la senescencia celular. Evaluamos la actividad de la enzima β -galactosidasa asociada a senescencia y de manera interesante observamos que el tratamiento con LMB disminuyó 50% el número de células senescentes en el cultivo HGPS1. Es intrigante

que el HGPS2 no haya respondido a la LMB, creemos que podría deberse a que la edad del donador del cultivo HGPS2 era de 14 años, prácticamente el final de la vida promedio de estos pacientes; en contraste, el donador del cultivo HGPS1 tenía 8 años de edad. Es probable que los fibroblastos HGPS2 presenten un mayor daño celular que les impida responder al tratamiento, ya que se ha reportado que conforme aumenta la edad hay acortamiento telomérico y daño al DNA (Hewitt, G. et al., 2012; Cao K. et al., 2011). Llevamos a cabo la comparación del efecto anti-senescente de la LMB con un fármaco ampliamente empleado en la clínica del HGPS, el inhibidor de la enzima farnesil transferasa denominado FTI-277. A pesar de que se ha reportado que el FTI-227 corrige el estrés nucleolar (Mehta, I. S. et al., 2010), no observamos que aliviara el fenotipo senescente. Este tratamiento está diseñado para evitar la farnesilación de la Progerina que causa el HGPS; sin embargo, a diferencia de la lámina A, la lámina B1 debe permanecer farnesilada para funcionar correctamente. Por lo tanto, el uso de FTI alteraría la farnesilación y por ende la función de la lámina B1, mientras que el empleo de LMB incrementa los niveles de la lámina B1 sin afectar su farnesilación.

Con la finalidad de profundizar sobre el mecanismo molecular que permite que la LMB alivia la senescencia celular, evaluamos si dicho tratamiento tiene un efecto sobre los niveles de la lámina B1. La lamina B1 es la molécula anti-senescencia maestra ya que se conoce que sus niveles deben de disminuir para que se establezca la senescencia. Consistentemente con nuestra idea, el tratamiento con LMB aumentó los niveles de la lámina B1 en ambos cultivos HGPS. Tomando en consideración que la normalización de la exportación nuclear de proteínas permite el regreso al núcleo de proteínas que se asocian funcionalmente con la lámina B1, como el β -DG (Martinez-Vieyra et al., 2013) y la Dp71 (Villareal.Silva), es probable que la lámina B1 recupere su correcta localización en la envoltura nuclear lo que redundaría en una mayor estabilidad de la molécula. Debido a que la lámina B1 controla la plasticidad de los nucléolos (Martin C. et al., 2009), la recuperación de sus niveles podría ser la base también del alivio del estrés nucleolar que promueve el tratamiento con LMB. Es importante señalar que la recuperación en los niveles de la lámina B1 tiene un gran

impacto, ya que los esfuerzos encaminados a la búsqueda de compuestos que incrementen sus niveles han fracasado. La recuperación de la lámina B1 a través de la normalización de la exportación nuclear de proteínas mediada por la LMB, debe reflejarse también en la recuperación de la marca de heterocromatina constitutiva H3K9me3 y en la respuesta de daño al DNA, marcas distintivas del HGPS (Shumaker, D. K. et al., 2016; Liu, N. A. et al., 2015). Finalmente demostramos que la corrección de la exportación nuclear por medio del tratamiento con LMB alivia la morfología celular senescente de los fibroblastos con el HGPS. Es posible que la normalización de la exportación nuclear disminuya la hipertrofia celular a través del regreso al núcleo de p53; se ha reportado que la acumulación nuclear de p53 disminuye la síntesis proteica exacerbada que genera hipertrofia celular (Demidenko, Z. N. et al., 2010).

En su conjunto nuestros resultados nos permiten plantear a la exportina CRM1 como un blanco terapéutico para el HGPS y específicamente para aliviar el fenotipo senescente, lo que tiene implicación en la disfunción cardiovascular asociada al envejecimiento fisiológico y al HGPS.

11. CONCLUSIÓN

- La normalización de la exportación nuclear a través del tratamiento con LMB alivia el fenotipo senescente del HGPS.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Alberts, B. B., Lewis, D., Raff, J., Roberts, M., Watson, K., & Alberts, J. D. B. (1996). *Biología molecular de la célula* (No. 576.3 BIO).
2. Becker, T., & Haferkamp, S. (2013). Molecular mechanisms of cellular senescence. In *Senescence and Senescence-Related Disorders*. InTech.
3. Benson, E. K., Lee, S. W., & Aaronson, S. A. (2010). Role of progerin-induced telomere dysfunction in HGPS premature cellular senescence. *Journal of cell science*, *123*(15), 2605-2612.
4. Boisvert, F. M., van Koningsbruggen, S., Navascués, J., & Lamond, A. I. (2007). The multifunctional nucleolus. *Nature reviews Molecular cell biology*, *8*(7), 574-585.
5. Boulon, S., Westman, B. J., Hutten, S., Boisvert, F. M., & Lamond, A. I. (2010). The nucleolus under stress. *Molecular cell*, *40*(2), 216-227.
6. Bratic, A., & Larsson, N. G. (2013). The role of mitochondria in aging. *The Journal of clinical investigation*, *123*(3), 951-957.
7. Butin-Israeli, V., Adam, S. A., Jain, N., Otte, G. L., Neems, D., Wiesmüller, L., ... & Goldman, R. D. (2015). Role of lamin b1 in chromatin instability. *Molecular and cellular biology*, *35*(5), 884-898.
8. Campisi, J., & di Fagagna, F. D. A. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature reviews Molecular cell biology*, *8*(9), 729-740.
9. Cao, K., Blair, C. D., Faddah, D. A., Kieckhafer, J. E., Olive, M., Erdos, M. R., ... & Collins, F. S. (2011). Progerin and telomere dysfunction collaborate to trigger cellular senescence in normal human fibroblasts. *The Journal of clinical investigation*, *121*(7), 2833-2844.
10. Capell, B. C., Erdos, M. R., Madigan, J. P., Fiordalisi, J. J., Varga, R., Conneely, K. N., ... & Collins, F. S. (2005). Inhibiting farnesylation of progerin prevents the characteristic nuclear blebbing of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(36), 12879-12884.
11. Carnero, A. (2013). Markers of cellular senescence. *Cell Senescence: Methods and Protocols*, 63-81.
12. Cau, P., Navarro, C., Harhour, K., Roll, P., Sigaudy, S., Kaspi, E., ... & Lévy, N. (2014, March). Nuclear matrix, nuclear envelope and premature aging syndromes in a translational research perspective. In *Seminars in cell & developmental biology*. Academic Press.
13. Capell, B. C., Erdos, M. R., Madigan, J. P., Fiordalisi, J. J., Varga, R., Conneely, K. N., ... & Collins, F. S. (2005). Inhibiting farnesylation of progerin prevents the characteristic nuclear blebbing of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(36), 12879-12884.
14. Capell, B. C., & Collins, F. S. (2006). Human laminopathies: nuclei gone genetically awry. *Nature reviews genetics*, *7*(12), 940-952.
15. Capell, B. C., Collins, F. S., & Nabel, E. G. (2007). Mechanisms of cardiovascular disease in accelerated aging syndromes. *Circulation Research*, *101*(1), 13-26.

16. Chen, J. H., Hales, C. N., & Ozanne, S. E. (2007). DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: causal or correlative?. *Nucleic acids research*, 35(22), 7417-7428.
17. De Vos, W. H., Houben, F., Kamps, M., Malhas, A., Verheyen, F., Cox, J., ... & van den Wijngaard, A. (2011). Repetitive disruptions of the nuclear envelope invoke temporary loss of cellular compartmentalization in laminopathies. *Human molecular genetics*, ddr344.
18. Decker, M. L., Chavez, E., Vulto, I., & Lansdorp, P. M. (2009). Telomere length in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Mechanisms of ageing and development*, 130(6), 377-383.
19. Demidenko, Z. N., Korotchkina, L. G., Gudkov, A. V., & Blagosklonny, M. V. (2010). Paradoxical suppression of cellular senescence by p53. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(21), 9660-9664.
20. di Fagagna, F. D. A., Reaper, P. M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., von Zglinicki, T., ... & Jackson, S. P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*, 426(6963), 194-198.
21. Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., ... & Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(20), 9363-9367.
22. Eriksson, M., Brown, W. T., Gordon, L. B., Glynn, M. W., Singer, J., Scott, L., ... & Dutra, A. (2003). Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature*, 423(6937), 293-298.
23. Freund, A., Laberge, R. M., Demaria, M., & Campisi, J. (2012). Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Molecular biology of the cell*, 23(11), 2066-2075.
24. Fu, S. C., Huang, H. C., Horton, P., & Juan, H. F. (2012). ValidNESs: a database of validated leucine-rich nuclear export signals. *Nucleic acids research*, gks936.
25. Fung, H. Y. J., & Chook, Y. M. (2014, August). Atomic basis of CRM1-cargo recognition, release and inhibition. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 27, pp. 52-61). Academic Press.
26. Goldman, R. D., Shumaker, D. K., Erdos, M. R., Eriksson, M., Goldman, A. E., Gordon, L. B., ... & Collins, F. S. (2004). Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(24), 8963-8968.
27. Gonzalez-Suarez, I., Redwood, A. B., Perkins, S. M., Vermolen, B., Lichtensztejin, D., Grotzky, D. A., ... & Sage, J. (2009). Novel roles for A-type lamins in telomere biology and the DNA damage response pathway. *The EMBO journal*, 28(16), 2414-2427.
28. Gorbunova, V., Seluanov, A., Mao, Z., & Hine, C. (2007). Changes in DNA repair during aging. *Nucleic acids research*, 35(22), 7466-7474.
29. Hegele, R. A., & Oshima, J. (2007). Phenomics and lamins: from disease to therapy. *Experimental cell research*, 313(10), 2134-2143.
30. Hein, N., Sanij, E., Quin, J., Hannan, K. M., Ganley, A., & Hannan, R. D. (2012). The nucleolus and ribosomal genes in aging and senescence. In *Senescence*. InTech.

31. Hennekam, R. (2006). Hutchinson–Gilford progeria syndrome: review of the phenotype. *American journal of medical genetics Part A*, 140(23), 2603-2624.
32. Herbig, U., Jobling, W. A., Chen, B. P., Chen, D. J., & Sedivy, J. M. (2004). Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21 CIP1, but not p16 INK4a. *Molecular cell*, 14(4), 501-513.
33. Hewitt, G., Jurk, D., Marques, F. D., Correia-Melo, C., Hardy, T., Gackowska, A., ... & Passos, J. F. (2012). Telomeres are favoured targets of a persistent DNA damage response in ageing and stress-induced senescence. *Nature communications*, 3, 708.
34. Hutchison, C. J. (2011). The role of DNA damage in laminopathy progeroid syndromes. *Biochemical Society Transactions*, 39(6), 1715-1718.
35. Hutten, S., & Kehlenbach, R. H. (2007). CRM1-mediated nuclear export: to the pore and beyond. *Trends in cell biology*, 17(4), 193-201.
36. Ikeda, Y., Kumagai, H., Motozawa, Y., Suzuki, J. I., Akazawa, H., & Komuro, I. (2016). Understanding vascular diseases: lessons from premature aging syndromes. *Canadian Journal of Cardiology*, 32(5), 650-658.
37. Johnson, S. C., Dong, X., Vijg, J., & Suh, Y. (2015). Genetic evidence for common pathways in human age-related diseases. *Aging cell*, 14(5), 809-817.
38. Kirkinezos, I. G., & Moraes, C. T. (2001, December). Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 12, No. 6, pp. 449-457). Academic Press.
39. Kirkwood, T. B., & Austad, S. N. (2000). Why do we age?. *Nature*, 408(6809), 233-238.
40. Kosugi, S., Hasebe, M., Tomita, M., & Yanagawa, H. (2008). Nuclear export signal consensus sequences defined using a localization-based yeast selection system. *Traffic*, 9(12), 2053-2062.
41. Kudlow, B. A., Stanfel, M. N., Burtner, C. R., Johnston, E. D., & Kennedy, B. K. (2008). Suppression of proliferative defects associated with processing-defective lamin A mutants by hTERT or inactivation of p53. *Molecular biology of the cell*, 19(12), 5238-5248.
42. La Cour, T., Kiemer, L., Mølgaard, A., Gupta, R., Skriver, K., & Brunak, S. (2004). Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Engineering Design and Selection*, 17(6), 527-536.
43. Lakatta, E. G. (2003). Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises. *Circulation*, 107(3), 490-497.
44. Lara-Chacón, B., De León, M. B., Leocadio, D., Gomez, P., Fuentes-Mera, L., Martínez-Vieyra, I., ... & Cisneros, B. (2010). Characterization of an Importin α/β -recognized nuclear localization signal in β -dystroglycan. *Journal of cellular biochemistry*, 110(3), 706-717.
45. Lattanzi, G., Marmiroli, S., Facchini, A., & Maraldi, N. M. (2012). Nuclear damages and oxidative stress: new perspectives for laminopathies. *European Journal of Histochemistry*, 56(4), 45.
46. Lee, B. Y., Han, J. A., Im, J. S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E. C., ... & Hwang, E. S. (2006). Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase. *Aging cell*, 5(2), 187-195.

47. Lindenboim, L., Borner, C., & Stein, R. (2011). Nuclear proteins acting on mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1813(4), 584-596.
48. Lindström, M. S., & Latonen, L. (2013). The nucleolus as a stress response organelle. In *Proteins of the Nucleolus* (pp. 251-273). Springer Netherlands.
49. Liu, B., Wang, J., Chan, K. M., Tjia, W. M., Deng, W., Guan, X., ... & Pei, D. (2005). Genomic instability in laminopathy-based premature aging. *Nature medicine*, 11(7), 780-785.
50. Liu, N. A., Sun, J., Kono, K., Horikoshi, Y., Ikura, T., Tong, X., ... & Tashiro, S. (2015). Regulation of homologous recombinational repair by lamin B1 in radiation-induced DNA damage. *The FASEB Journal*, 29(6), 2514-2525.
51. Liu, Y., Rusinol, A., Sinensky, M., Wang, Y., & Zou, Y. (2006). DNA damage responses in progeroid syndromes arise from defective maturation of prelamin A. *J Cell Sci*, 119(22), 4644-4649.
52. Lombard, D. B., Chua, K. F., Mostoslavsky, R., Franco, S., Gostissa, M., & Alt, F. W. (2005). DNA repair, genome stability, and aging. *Cell*, 120(4), 497-512.
53. López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6), 1194-1217.
54. Malhas, A. N., Lee, C. F., & Vaux, D. J. (2009). Lamin B1 controls oxidative stress responses via Oct-1. *The Journal of cell biology*, 184(1), 45-55.
55. Manju, K., Muralikrishna, B., & Parnaik, V. K. (2006). Expression of disease-causing lamin A mutants impairs the formation of DNA repair foci. *Journal of cell science*, 119(13), 2704-2714.
56. Marín-García, J. (2012). *Mitochondria and their role in cardiovascular disease*. Springer Science & Business Media.
57. Martin, C., Chen, S., Maya-Mendoza, A., Lovric, J., Sims, P. F., & Jackson, D. A. (2009). Lamin B1 maintains the functional plasticity of nucleoli. *Journal of cell science*, 122(10), 1551-1562.
58. Martinez-Vieyra, I.A., Vasquez-Limeta, A., Gonzalez-Ramirez, R., Morales-Lazaro, S.L., Mondragon, M., Mondragon, R., Ortega, A., Winder, S.J., and Cisneros, B. (2013). A role for beta-dystroglycan in the organization and structure of the nucleus in myoblasts. *Biochim Biophys Acta* 1833, 698-711.
59. McCord, R. P., Nazario-Toole, A., Zhang, H., Chines, P. S., Zhan, Y., Erdos, M. R., ... & Cao, K. (2013). Correlated alterations in genome organization, histone methylation, and DNA-lamin A/C interactions in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Genome research*, 23(2), 260-269.
60. Mehta, I. S., Bridger, J. M., & Kill, I. R. (2010). Progeria, the nucleolus and farnesyltransferase inhibitors. *Biochemical Society Transactions*, 38(1), 287-291.
61. Minamino, T., & Komuro, I. (2008). Vascular aging: insights from studies on cellular senescence, stem cell aging, and progeroid syndromes. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, 5(10), 637-648.
62. Minamino, T., Miyauchi, H., Yoshida, T., Tateno, K., Kunieda, T., & Komuro, I. (2004). Vascular cell senescence and vascular aging. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 36(2), 175-183.

63. Moslehi, J., DePinho, R. A., & Sahin, E. (2012). Telomeres and mitochondria in the aging heart. *Circulation research*, *110*(9), 1226-1237.
64. Muñoz-Espín, D., & Serrano, M. (2014). Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nature reviews Molecular cell biology*, *15*(7), 482-496.
65. Pegoraro, G., & Misteli, T. (2009). The central role of chromatin maintenance in aging. *Aging (Albany NY)*, *1*(12), 1017-1022.
66. Pekovic, V., Gibbs-Seymour, I., Markiewicz, E., Alzoghaibi, F., Benham, A. M., Edwards, R., ... & Hutchison, C. J. (2011). Conserved cysteine residues in the mammalian lamin A tail are essential for cellular responses to ROS generation. *Aging cell*, *10*(6), 1067-1079.
67. Rodier, F., & Campisi, J. (2011). Four faces of cellular senescence. *The Journal of cell biology*, jcb-201009094.
68. Rodriguez, M., Rodriguez-Sabate, C., Morales, I., Sanchez, A., & Sabate, M. (2015). Parkinson's disease as a result of aging. *Aging cell*, *14*(3), 293-308.
69. Rosete, M., Padrós, M. R., & Vindrola, O. (2007). El nucléolo como un regulador del envejecimiento celular. *Medicina (Buenos Aires)*, *67*(2), 183-194.
70. Rufini, A., Tucci, P., Celardo, I., & Melino, G. (2013). Senescence and aging: the critical roles of p53. *Oncogene*, *32*(43), 5129-5143.
71. Sadaie, M., Salama, R., Carroll, T., Tomimatsu, K., Chandra, T., Young, A. R., ... & Kimura, H. (2013). Redistribution of the Lamin B1 genomic binding profile affects rearrangement of heterochromatic domains and SAHF formation during senescence. *Genes & development*, *27*(16), 1800-1808.
72. Sahin, E., & DePinho, R. A. (2012). Axis of ageing: telomeres, p53 and mitochondria. *Nature reviews Molecular cell biology*, *13*(6), 397-404.
73. Sedelnikova, O. A., Horikawa, I., Zimonjic, D. B., Popescu, N. C., Bonner, W. M., & Barrett, J. C. (2004). Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unrepairable double-strand breaks. *Nature cell biology*, *6*(2), 168-170.
74. Seo, A. Y., Joseph, A. M., Dutta, D., Hwang, J. C., Aris, J. P., & Leeuwenburgh, C. (2010). New insights into the role of mitochondria in aging: mitochondrial dynamics and more. *Journal of cell science*, *123*(15), 2533-2542.
75. Shah, P. P., Donahue, G., Otte, G. L., Capell, B. C., Nelson, D. M., Cao, K., ... & Gregory, B. D. (2013). Lamin B1 depletion in senescent cells triggers large-scale changes in gene expression and the chromatin landscape. *Genes & development*, *27*(16), 1787-1799.
76. Sharpless, N. E., & Sherr, C. J. (2015). Forging a signature of in vivo senescence. *Nature Reviews Cancer*, *15*(7), 397-408.
77. Shimi, T., Butin-Israeli, V., Adam, S. A., Hamanaka, R. B., Goldman, A. E., Lucas, C. A., ... & Goldman, R. D. (2011). The role of nuclear lamin B1 in cell proliferation and senescence. *Genes & development*, *25*(24), 2579-2593.
78. Shimi, T., & Goldman, R. D. (2014). Nuclear lamins and oxidative stress in cell proliferation and longevity. In *Cancer Biology and the Nuclear Envelope* (pp. 415-430). Springer New York.
79. Shumaker, D. K., Dechat, T., Kohlmaier, A., Adam, S. A., Bozovsky, M. R., Erdos, M. R., ... & Jenuwein, T. (2006). Mutant nuclear lamin A leads to progressive

- alterations of epigenetic control in premature aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(23), 8703-8708.
80. Sieprath, T., Darwiche, R., & De Vos, W. H. (2012). Lamins as mediators of oxidative stress. *Biochemical and biophysical research communications*, 421(4), 635-639.
 81. Stancheva, I., & Schirmer, E. C. (2014). Nuclear envelope: connecting structural genome organization to regulation of gene expression. In *Cancer Biology and the Nuclear Envelope* (pp. 209-244). Springer New York.
 82. Takada, H., & Kurisaki, A. (2015). Emerging roles of nucleolar and ribosomal proteins in cancer, development, and aging. *Cellular & Molecular Life Sciences*, 72(21).
 83. Toth, J. I., Yang, S. H., Qiao, X., Beigneux, A. P., Gelb, M. H., Moulson, C. L., ... & Fong, L. G. (2005). Blocking protein farnesyltransferase improves nuclear shape in fibroblasts from humans with progeroid syndromes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(36), 12873-12878.
 84. Tsurumi, A., & Li, W. (2012). Global heterochromatin loss: a unifying theory of aging?. *Epigenetics*, 7(7), 680-688.
 85. Turner, J. G., Dawson, J., & Sullivan, D. M. (2012). Nuclear export of proteins and drug resistance in cancer. *Biochemical pharmacology*, 83(8), 1021-1032.
 86. Vigneron, A., & Vousden, K. H. (2010). p53, ROS and senescence in the control of aging. *Aging (Albany NY)*, 2(8), 471-474.
 87. Viteri, G., Chung, Y. W., & Stadtman, E. R. (2010). Effect of progerin on the accumulation of oxidized proteins in fibroblasts from Hutchinson Gilford progeria patients. *Mechanisms of ageing and development*, 131(1), 2-8.
 88. Wen, W., Meinkoth, J. L., Tsien, R. Y., & Taylor, S. S. (1995). Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell*, 82(3), 463-473.
 89. Worman, H. J., & Bonne, G. (2007). "Laminopathies": a wide spectrum of human diseases. *Experimental cell research*, 313(10), 2121-2133.
 90. Xiong, Z. M., Choi, J. Y., Wang, K., Zhang, H., Tariq, Z., Wu, D., ... & Cao, K. (2015). Methylene blue alleviates nuclear and mitochondrial abnormalities in progeria. *Aging cell*.
 91. Xu, D., Grishin, N. V., & Chook, Y. M. (2012). NESdb: a database of NES-containing CRM1 cargoes. *Molecular biology of the cell*, 23(18), 3673-3676.
 92. Young, A. R. J., Narita, M., & Narita, M. (2013). Cell senescence as both a dynamic and a static phenotype. *Cell Senescence: Methods and Protocols*, 1-13.
 93. Zhang, H., Sun, L., Wang, K., Wu, D., Trappio, M., Witting, C., & Cao, K. (2016). Loss of H3K9me3 Correlates with ATM Activation and Histone H2AX Phosphorylation Deficiencies in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *PloS one*, 11(12), e0167454.
 94. Zhang, J., Rane, G., Dai, X., Shanmugam, M. K., Arfuso, F., Samy, R. P., ... & Sethi, G. (2016). Ageing and the telomere connection: An intimate relationship with inflammation. *Ageing research reviews*, 25, 55-69.
 95. Zhang, W., Li, J., Suzuki, K., Qu, J., Wang, P., Zhou, J., ... & Yuan, T. (2015). A Werner syndrome stem cell model unveils heterochromatin alterations as a driver of human aging. *Science*, 348(6239), 1160-1163.