



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Efecto del selinexor sobre la reparación del DNA en fibroblastos de
pacientes con el síndrome de progeria Hutchinson-Gilford (HGPS)”**

TESIS

Que presenta:

LBT. RENÉ QUIROZ MORALES

Para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

Con especialidad en:

GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Director de tesis:

Dr. En Cs. Bulmaro Cisneros Vega

Ciudad de México

Marzo, 2024

Este trabajo fue realizado en su totalidad dentro del departamento de genética y biología molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV), bajo la dirección y tutoría del D. en Cs. Bulmaro Cisneros Vega así como la asesoría del D. en Cs. José Manuel Hernández Hernández y del D. en Cs. José Efraín Garrido Guerrero

De igual manera, este trabajo fue posible gracias al apoyo económico como becario CONACYT con número de registro: **1078246**.

Agradecimientos

- Quisiera agradecer al Dr. Bulmaro Cisneros por el espacio brindado dentro del grupo de trabajo, así como todo el aprendizaje obtenido durante mi estancia de maestría en el laboratorio.
- A mis compañeros y amigos del laboratorio Tania, Juan, Gabriela, Ale, Marlon, Jessica e Ian; que siempre buscan ser mejores personas y profesionistas, además de traer alegría y solidaridad al grupo de trabajo.
- A Vero y Pablo, por siempre proveernos del material y reactivos necesarios, por su gran labor dentro del laboratorio que permite al mismo seguir funcionando.
- A mi madre por todo su apoyo brindado, sus palabras y la formación que hizo en mí la persona que hoy día soy, por la fortaleza que forjó en mí y por la nobleza y coraje que me transmitiste desde pequeño.
- A mi hermana por su fascinación y admiración por la ciencia, siempre me has hecho creer en lo que hago y me has enseñado que la ciencia es más que simples números, datos y resultados.
- Finalmente quisiera agradecerte a ti Adri, que siempre has creído en mí, me has motivado y me has ayudado a levantarme. Que me has enseñado que la vida es mucho más que solo hacer ciencia y que los sueños se construyen día a día.

“La humildad surge cuando entendemos que jamás podremos entender la esencia de la naturaleza y comenzamos a maravillarnos de fenómenos tan maravillosos como que la coraza de un armadillo es a prueba de balas o tan complejos como el mundo subatómico donde nada es como debería ser. De esta manera es que podemos sentir el terror y la aceptación al pensar sobre la inmensidad del cosmos.”

Resumen

El Síndrome de Progeria de Hutchinson-Gilford (HGPS) se caracteriza por un envejecimiento prematuro y acelerado, lo que se debe a la expresión de una variante mutante de la lámina A denominada progerina. Una nueva marca del HGPS descrita por nuestro laboratorio es la hiperactividad de la exportación nuclear de proteínas mediado por CRM1. De manera interesante la inhibición farmacológica de CRM1 con selinexor alivia diferentes marcas de senescencia celular y promueve la degradación de progerina. En este trabajo analizamos si el selinexor tiene un efecto benéfico sobre la respuesta de daño al ADN en cultivos de fibroblastos dermales provenientes de pacientes con HGPS. La respuesta de daño al ADN la evaluamos mediante el análisis de la forma fosforilada de la histona H2AX (γ H2AX) y la fosforilación de la cinasa ATM (pATM), componentes esenciales del aparato de reparación de ADN. Observamos que cuando se induce daño al ADN con Doxorrubicina, los fibroblastos HGPS tienen una respuesta deficiente en comparación con el cultivo WT. De manera interesante, el tratamiento con selinexor eficientiza la respuesta de daño al ADN de los fibroblastos HGPS, lo que implica que la normalización del tráfico núcleo-citoplasmático y la disminución de progerina, promovidos por el selinexor, tienen un efecto benéfico sobre la estabilidad genómica.

Abstract

Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome (HGPS) is characterized by premature and accelerated aging, which is due to the expression of a mutant variant of lamin A termed progerin. A new hallmark of HGPS described by our laboratory is the hyperactivity of the CRM1-mediated nuclear export pathway. Interestingly selinexor-mediated pharmacological inhibition of CRM1 alleviates different marks of cellular senescence and promotes also progerin degradation. In this work we analyzed whether selinexor has a beneficial effect on the DNA damage response in dermal fibroblasts from HGPS patients. We assessed the DNA damage response by analyzing the phosphorylated forms of the histone H2AX (γ H2AX) and the kinase ATM (pATM), essential components of the DNA repair apparatus. We found that HGPS fibroblasts have a deficient response to DNA damage induced by Doxorubicin, compared to WT culture. Interestingly, treatment with selinexor enhances the DNA damage response of HGPS fibroblasts, implying that this drug has a beneficial effect on genomic stability by both normalizing the nucleo-cytoplasmic trafficking of proteins and promoting progerin clearance.

INDICE

Agradecimientos	3
Resumen.....	4
Abstract.....	5
Introducción.....	10
Envejecimiento y senescencia.....	10
Bases moleculares del síndrome de Progeria de Hutchinson-Gilford (HGPS)	11
La respuesta de daño al ADN (DDR) en el HGPS.....	14
Inestabilidad genómica	15
Disfunción telomérica.....	16
Estado actual de las terapias contra HGPS.....	17
Respuesta del daño al ADN.....	18
Selinexor (KPT-330)	19
Doxorrubicina.....	20
Vía de reparación no homóloga (NHEJ)	21
Respuesta de daño al DNA (DDR) en las células HGPS.....	23
Antecedentes	26
Aumento de la exportación nuclear y deslocalización de proteínas en los fibroblastos HGPS	26
Justificación.....	31
Objetivos	31
Generales	31

Particulares.....	31
Hipótesis	31
Estrategia experimental	32
Materiales y métodos	33
Modelo de estudio.....	33
Cultivo celular	35
Fármacos utilizados	36
Tratamientos.....	36
Doxorrubicina:.....	36
Selinexor:.....	37
Tratamiento combinado:	37
Anticuerpos.....	37
Inmunofluorescencia indirecta acoplada con microscopia confocal.....	37
Extracción de proteínas totales y ensayos de Western Blot	38
Resultados	40
La respuesta de daño al ADN está alterada en los fibroblastos HGPS	40
Análisis de los niveles relativos de la histona γ H2AX por inmunodetección en fase solida.....	45
Activación de la cinasa ATM durante la respuesta de daño al ADN	47
Discusión	56
Conclusiones	58
Referencias.....	58

Tabla de figuras

Figura 1. Imagen de dos niños con HGPS	11
Figura 2. Procesamiento aberrante de la lámina A	13
Figura 3. Fibroblastos de pacientes con HGPS.....	14
Figura 4. Relación entre el acortamiento telomérico y el mecanismo de reparación del ADN	16
Figura 5. Mecanismo de respuesta de daño al ADN	19
Figura 6. Estructura química del selinexor	19
Figura 7. Mecanismo de reclutamiento de la vía no homóloga e inhibición de la vía homóloga. durante la fase G1 de ciclo celular	23
Figura 8. Mecanismo general de reparación del DNA por la vía no homóloga (NEHJ)	24
Figura 9. Deficiente respuesta de daño al DNA en las células HGPS	25
Figura 10 Las células HGPS tienen un retraso para reclutar la maquinaria de respuesta de daño al ADN después de la inducción con doxorubicina	26
Figura 11. Exportación nuclear exacerbada en los fibroblastos HGPS	27
Figura 12. El selinexor reduce los niveles de CRM1 y progerina en los fibroblastos HGPS	28
Figura 13. El tratamiento con selinexor recuperó la marca de heterocromatina H3K9m3 en los fibroblastos HGPS	30
Figura 14. El tratamiento con selinexor disminuyó las especies reactivas de oxígeno en los fibroblastos HGPS.....	30
Figura 15 Estrategia experimental	33
Figura 16. Imagen de fibroblastos de un individuo aparentemente saludable	34
Figura 17. El tratamiento con Doxorubicina indujo la fosforilación de la histona γ H2AX en los cultivos WT.....	41
Figura 18. El tratamiento con Doxorubicina indujo la fosforilación de la histona H2AX en los cultivos HGPS	42
Figura 19. Análisis comparativo de la inducción de γ H2AX entre el cultivo WT y el cultivo HGPS	43
Figura 20. Análisis cuantitativo de la cantidad de focos de γ H2AX entre los cultivos WT y HGPS.....	44
Figura 21. Los fibroblastos HGPS presentan una menor activación de la histona γ H2AX después del tratamiento con Doxorubicina	45
Figura 22. Cuantificación de γ H2AX en los fibroblastos WT y HGPS después de la inducción de daño al ADN con Doxorubicina	46

Figura 23. La señal nuclear de pATM se incrementó en los fibroblastos WT después del tratamiento con Doxorubicina	47
Figura 24. La señal nuclear de pATM se incrementó en los fibroblastos HGPS después del tratamiento con Doxorubicina	48
Figura 25. El nivel de la cinasa ATM fosforilada es mayor en los fibroblastos HGPS.....	48
Figura 26. El tratamiento con selinexor disminuyó la activación de γ H2AX en los fibroblastos WT..	50
Figura 27. El tratamiento con selinexor aumentó la activación de γ H2AX en los fibroblastos HGPS.	51
Figura 28. El selinexor tiene un efecto diferente sobre la activación de γ H2AX entre los cultivos WT y HGPS.....	52
Figura 29. Evaluación del contenido de γ H2AX después del tratamiento con selinexor y la inducción de daño al ADN con Doxorubicina en los cultivos WT y HGPS	52
Figura 30. Localización subcelular de la cinasa ATM fosforilada (pATM) en los cultivos WT tratados con selinexor previamente a la inducción de daño al ADN con Doxorubicina.....	53
Figura 31. Localización subcelular de la cinasa ATM fosforilada (pATM) en los cultivos HGPS tratados con selinexor previamente a la inducción de daño al ADN con Doxorubicina	54
Figura 32. Imagen comparativa de la localización subcelular de pATM en los cultivos WT y HGPS tratados con selinexor y Doxorubicina.	55

Introducción

Envejecimiento y senescencia

El envejecimiento desde un punto de vista biológico es un proceso degenerativo, gradual y adaptativo que ocurre de manera natural debido a procesos multifactoriales que conllevan a la pérdida de las funciones físicas y mentales del individuo, debido al desgaste celular ocasionado por el paso de los años. Este proceso posee un origen multifactorial ¹.

El envejecimiento es el resultado de la pérdida de las funciones celulares que ocasionan que las células puedan ser inducidas a muerte celular (apoptosis) o senescencia (detención de su ciclo celular como respuesta a cualquier tipo de daño o estrés) ². A nivel celular/molecular, el envejecimiento presenta marcas distintivas que incluyen inestabilidad genómica, acortamiento de telómeros, alteraciones epigenéticas, pérdida de la proteóstasis, alteración de la comunicación intercelular, agotamiento de células madre, desregulación en la toma de nutrientes, disfunción mitocondrial y alteración de la señalización intercelular ^{3,4}.

Bases moleculares del síndrome de Progeria de Hutchinson-Gilford (HGPS)

El síndrome de progeria Hutchinson-Gilford (HGPS) es una enfermedad espontánea que se caracteriza por manifestar un fenotipo de envejecimiento prematuro (**Fig.1**). El HGPS tiene una incidencia de 1:4'000'000 infantes, y es letal, con una expectativa de vida alrededor de los 13 años. La causa de muerte es por fallas cardíacas ⁵. El HGPS es causado por una mutación puntual en el gen LMNA que codifica para las proteínas de la lámina nuclear A y C, pertenecientes a su vez a la envoltura nuclear. Esta laminopatía ocasiona envejecimiento prematuro que se caracteriza por pérdida de peso, cabello, densidad ósea y capacidad audiovisual, así como por la presencia de artritis, arterosclerosis generalizada; y arrugas y manchas en la piel. ⁶.



Figura 1. Imagen de dos niños con HGPS. Obtenida de RL Pollex y RA Hegele, 2004.

A nivel molecular el HGPS se origina por un mal procesamiento de la lámina, debido al uso de un sitio de *splicing* críptico en el exón 11 del gen LMNA,

ocasionado por la mutación puntual (1824 C>T), la cual es silenciosa ya que no genera un cambio en el aminoácido codificante. La variante mutante de la prelámina-A (conocida como progerina), carece de 150 nucleótidos a nivel de RNA mensajero y de 50 aminoácidos a nivel de proteína ⁶. La maduración de la prelámina-A da inicio con una farnesilación (el farnesilo es un lípido de 15 carbonos) en el grupo tiol de la cisteína (C) del motivo CAAX, donde A es cualquier residuo alifático y X cualquier aminoácido. Posteriormente, la molécula se transporta a la envoltura nuclear; y en un segundo paso de maduración los 3 aminoácidos terminales (-AAX) son escindidos de la prelámina-A quedando como aminoácido terminal la cisteína farnesilada; este corte lo realiza la metaloproteínasa denominada Zmpste24. Por último, se lleva a cabo una metilación de la cisteína farnesilada por la acción de la enzima isoprenilcisteína carboxilo metiltransferasa, localizada también en retículo endoplasmático. Enseguida, las importinas transportan a la prelámina-A hacia el núcleo a través de los poros nucleares, donde finalmente esta proteína inmadura experimenta nuevamente un corte proteolítico por acción de la proteasa Zmpste24 para que se eliminen los últimos 15 aminoácidos del extremo carboxilo. La lámina-A madura se fija en la envoltura nuclear interna para interactuar con diversas proteínas ^{7,8,9}.

En el HGPS, la progerina sufre los cambios de farnesilación, metilación y su translocación hacia el núcleo, pero su segmento terminal de 15 aminoácidos no puede ser escindido por la proteasa Zmpste24 (**Fig. 2**). Esto debido a que la secuencia que reconoce esta enzima está ausente, por lo tanto, la progerina permanece farnesilada. La progerina se acumula en el núcleo alterando la estructura y función de la envoltura nuclear, lo que a su vez ocasiona inestabilidad genómica ^{7,8,9}.

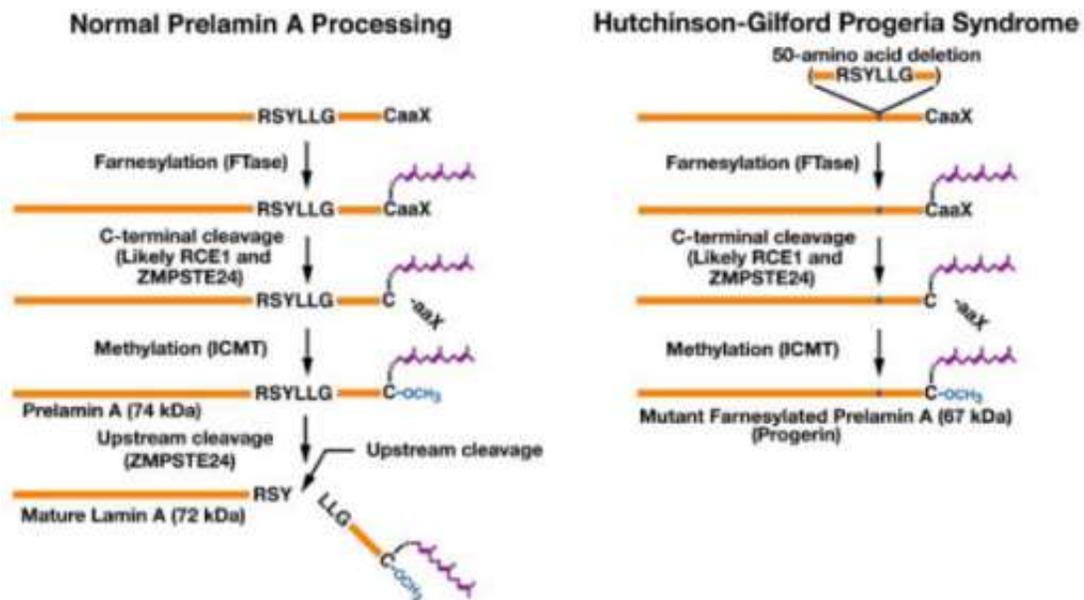


Figura 2. Procesamiento aberrante de la lámina A. Mecanismo que genera la proteína mutante llamada progerina (derecha), en comparación con el procesamiento normal de la lámina A (izquierda), tomada de: Coutinho, H.D.M., et al., 2009.

A nivel celular, la presencia de la progeria induce senescencia, la cual se caracteriza por una morfología celular aplanada y alargada, una morfología nuclear aberrante y la presencia de nucléolos expandidos, entre otras características (**Fig.3**). Ian García-Aguirre y colaboradores describieron en el año 2019 otra alteración que se encuentra en el HGPS, la cual es la exacerbación del mecanismo de exportación nuclear de proteínas ²¹.

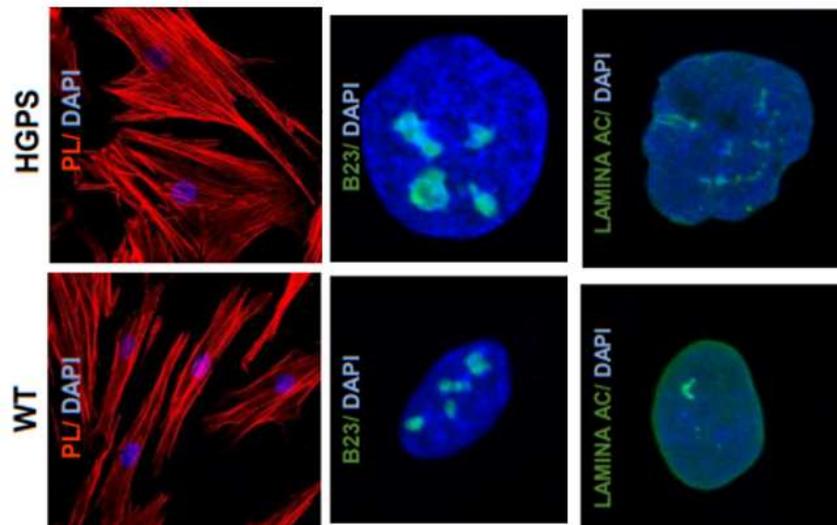


Figura 3. Fibroblastos de pacientes con HGPS. Los fibroblastos HGPS presentan una morfología celular aplanada y alargada, en comparación con la forma fusiforme de los fibroblastos silvestres. Asimismo, los fibroblastos HGPS presentan núcleos deformes y nucléolos largados, en comparación con los fibroblastos silvestres. Resultados no publicados de la M. en C Luz Adriana Soto Ponce.

La respuesta de daño al ADN (DDR) en el HGPS

El fenotipo celular característico del HGPS es la senescencia, ocasionada por la maduración incorrecta de la prelámina que da lugar a la progerina; y a nivel de organismo se caracteriza por envejecimiento acelerado, en el HGPS se altera la señalización de la respuesta de daño al ADN³⁴. No obstante, existe cierta controversia sobre el comportamiento de este proceso celular en el HGPS. Por ejemplo, Liu y colaboradores en 2006 reportaron que un cultivo de fibroblastos de individuo con HGPS mostró una cantidad mayor de la forma fosforilada de la histona H2AX (γ H2AX) H2AX. Esta modificación de la histona H2AX es ejecutada por la forma activa de ATM (pATM S1981), y sirve como quimioatrayente para reclutar la maquinaria de reparación del ADN; por lo tanto, este resultado sugiere que el mecanismo de reparación del ADN está activado en las células HGPS. Sin embargo, la respuesta del daño al ADN no es un mecanismo tan sencillo de comprender y como veremos a continuación, algunos otros factores podrían estar influyendo tanto en la respuesta de daño

al ADN (DDR) así como en la reparación de daño al ADN¹¹. Por ejemplo, la presencia de niveles elevados de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los cultivos de fibroblastos HGPS se asocia con errores durante la replicación, así como con la inducción de daño al ADN, específicamente cortes en la doble cadena (DSB).

Por otra parte, José Rivera-Torres y colaboradores en 2013, mediante marcaje con isótopos estables hallaron que en el HGPS existen niveles bajos de proteínas involucradas en la fosforilación oxidativa mitocondrial, con lo que se asoció a una disfunción mitocondrial por la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) tanto en fibroblastos humanos con HGPS como en los fibroblastos del modelo de ratón que porta la mutación en el gen LMNA (Lmna^{G609G/G609G}), y de igual manera hallaron estos resultados en tejido obtenido de dichos ratones¹². Dichos precedentes sentaron al estrés oxidativo como una marca asociada al envejecimiento y a la inestabilidad genómica.

Inestabilidad genómica

Una marca asociada al envejecimiento tanto prematuro como inducido es la presencia de inestabilidad genómica, misma que es inducida en presencia de factores exógenos como la radiación ionizante, agentes químicos y/o fármacos, así como por factores endógenos como errores durante la replicación y presencia de radicales libres. La alteración en las marcas epigenéticas asociadas a los niveles de heterocromatina como es el caso de la marca H3K9me3 también inducen a una inestabilidad genómica y de igual manera la disfunción telomérica, ya sea por la pérdida y/o acortamiento de los telómeros, contribuyen a una mayor presencia y/o acumulación de daño al ADN

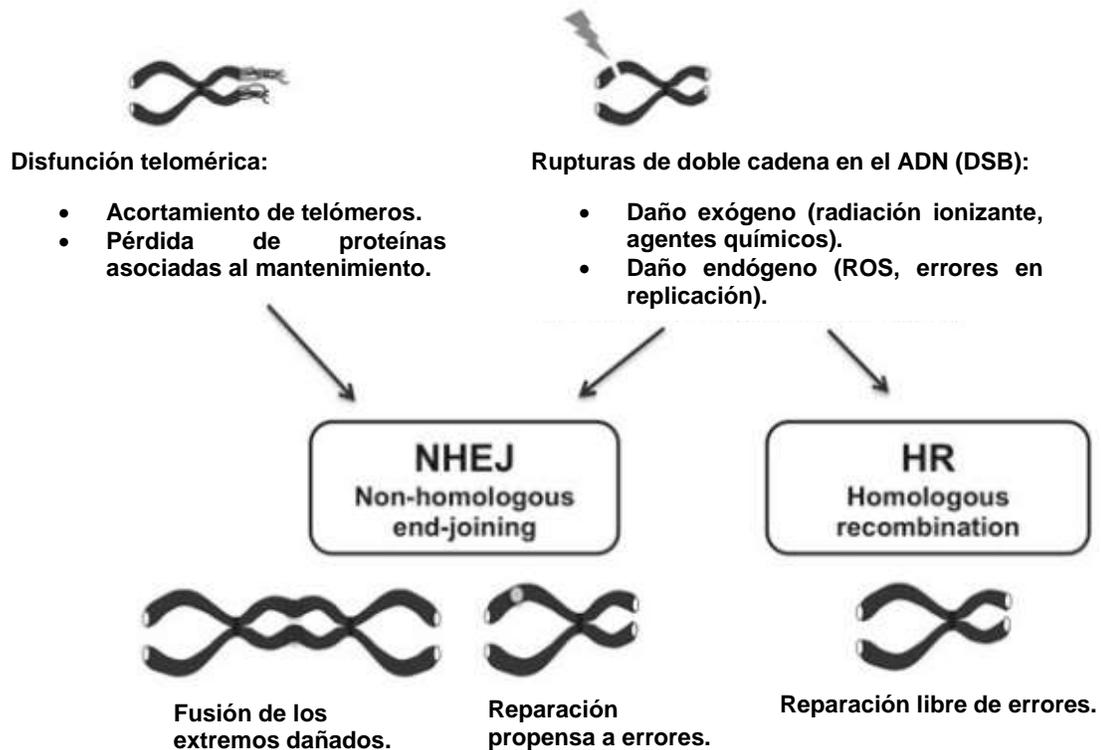


Figura 4. Relación entre el acortamiento telomérico y el mecanismo de reparación del ADN. Ambos procesos son fundamentales para evitar inestabilidad genómica y acumulación de daño en el ADN. Imagen modificada de S. Gonzalo, 2014.

Disfunción telomérica

El acortamiento telomérico, así como la pérdida de protección en los extremos de los telómeros, inducen cortes en la doble cadena de ADN (DSB), ocasionando aberraciones cromosomales. En el síndrome de HGPS se ha observado que esta alteración se encuentra exacerbada, lo que ocasiona una senescencia prematura. Se ha descrito además que, la presencia de progerina conlleva a una disfunción telomérica y con ello se induce la acumulación de daño en el ADN, que desencadena un arresto proliferativo¹³.

Zhang y colaboradores en 2016 mostraron que los niveles de la forma fosforilada de la histona H2AX (γ H2AX) se encuentran muy bajos en

fibroblastos con HGPS, lo cual afecta la cascada de señalización en el reclutamiento de factores involucrados en la reparación del ADN^{14,15}.

Se ha observado que factores como 53BP1, Rad50 y Rad51 tienen un retraso en su reclutamiento hacia los sitios de lesión dentro del ADN, generando así, una acumulación de diferentes tipos de daño en el ADN, como lo son los cortes de una o ambas cadenas del ADN (SSB y DSB respectivamente)^{16,17}. Debido a que en el HGPS existe una disfunción telomérica y estrés oxidativo, existe acumulación de daño en el ADN así como un retraso en la respuesta y reparación de daño al ADN, lo que conlleva a un envejecimiento celular prematuro y senescencia replicativa.

Estado actual de las terapias contra HGPS

Actualmente existen diferentes acercamientos y terapias contra el síndrome de progeria (HGPS), empezando por el uso de herramientas dirigidas a la edición del genoma como CRISPR/Cas9, con la finalidad de eliminar la mutación que causa el HGPS del genoma, ya que la acumulación de progerina es la causa del fenotipo de la enfermedad ¹⁸. Otra terapia en desarrollo es el uso de oligos antisentido, dirigidos contra el sitio del procesamiento críptico, ubicado en el en el exón 11 del gen LMNA. Esto impediría la generación del mRNA de la progerina ¹⁹. Sin embargo, estas terapias están actualmente en fase experimental. A la fecha, la principal terapia utilizada es la farmacológica, empleando inhibidores de la farnesilación de la prelámina-A, con la finalidad de evitar la acumulación de la proteína farnesilada en la envoltura nuclear. Sin embargo, esta terapia ocasiona cardiotoxicidad como efecto secundario; por lo tanto, se tiene que administrar cardioprotectores como complemento a la terapia farmacológica ^{20 y 21}.

Respuesta del daño al ADN

En los últimos años se ha descrito que las láminas nucleares tienen un papel importante en la organización de la estructura de la cromatina, ya que proveen un andamiaje para el reclutamiento de complejos de proteínas asociadas a la envoltura nuclear y/o la cromatina, así como para la interacción entre la cromatina y las láminas nucleares por medio de los Dominios Asociados a Láminas (DAL) ¹³.

Es través del reclutamiento de la cinasa ATM que se lleva a cabo la activación de la respuesta de daño al ADN. Este proceso comienza cuando ocurre un corte en la doble hebra del ADN, ocasionado por radiación ionizante o agentes químicos. Dicha ruptura en la doble hebra genera una cascada de señalización que inicia con el reclutamiento de la cinasa ATM en su forma dimérica hacia el complejo MRN compuesto de 3 proteínas (MRE 11, NBS1 y RAD 50). Es mediante la proteína NBS1, que se lleva a cabo el reclutamiento de la cinasa ATM para formar el complejo MRN-ATM, a su vez que se facilita la autofosforilación de ATM (pATM) en el residuo de Serina 1981. Su cambio de conformación permite la formación del complejo MRN-pATM sobre el sitio de la lesión. Así mismo, la histona H2AX es fosforilada en la serina 139 para originar la histona γ H2AX. Esto permite la interacción del residuo de Serina 139 de la histona fosforilada con los dominios BRCT de la proteína MDC1 estabilizando así el complejo MDC1/MRN/ATM, permitiendo que la cinasa pATM fosforile la histona H2AX, incrementando la señalización en la región del sitio de doble ruptura¹⁴.

Este complejo (MDC1/MRN/ATM) permite el reclutamiento de otras proteínas como RNF8 y RNF168 (proteínas E3 ubiquitina ligasas), que mediante la ubiquitinación de RNF8 hacia proteínas en la proximidad del sitio de lesión, entre ellas la histona 1 (H1), se logra el reclutamiento y anclaje de RNF 168 para la posterior ubiquitinación de las histonas H2A y H2AX. Paralelamente, la

metilación en la lisina 20 de la histona 4 (H4K20me) permite el anclaje de la proteína 53BP1, involucrada directamente en el proceso de reparación de daño al ADN, así como de proteínas efectoras como RIF1 y PTIP. De esta manera se regula la vía de reparación de daño al ADN.²⁵ Ver **Figura 8**.

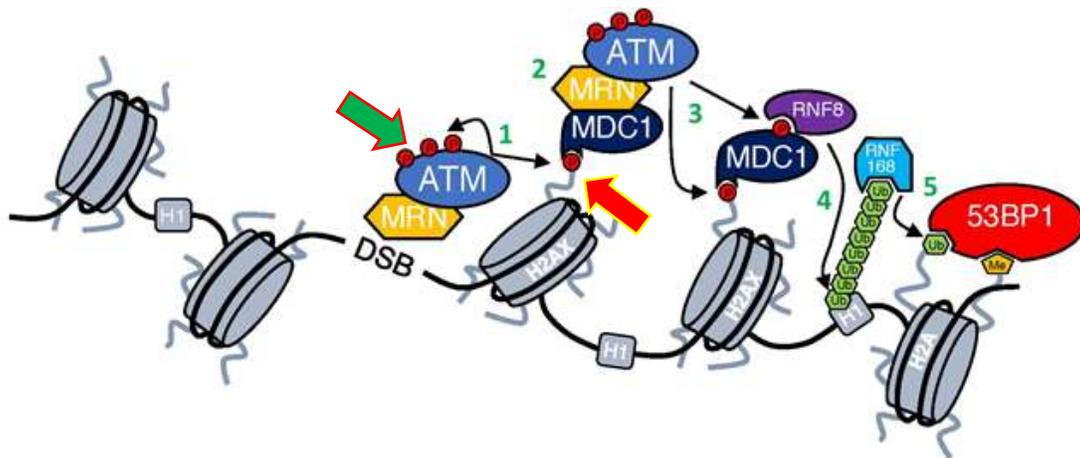


Figura 5. Mecanismo de respuesta de Daño al ADN. ATM (1) es reclutada al sitio de lesión, mediante los complejos MRN (2) y MDC1 que funcionan como andamiaje para que ATM pueda auto escindir y autofosforilarse (flecha verde), fosforilar a la histona H2AX (flecha roja) (3) y a MDC1. En su conjunto, esto permite el reclutamiento de una ubiquitina ligasa (RNF8) para que haya otras modificaciones en la cromatina como la ubiquitinación de la histona H1 y de la histona H2AX, mediada por RNF8 (3), para que se permita el proceso de metilación de la histona H2AX y a su vez el reclutamiento de la proteína 53BP1 (5). Esta última determina el tipo de reparación que se llevará a cabo. Imagen modificada de Adamowicz, 2018.

Selinexor (KPT-330)

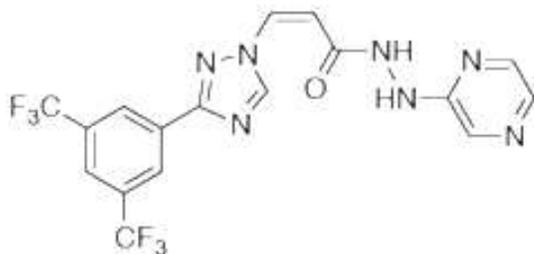


Figura 6. Estructura química del selinexor.

El selinexor fue desarrollado para el tratamiento de mieloma múltiple, en donde evita que oncoproteínas y proteínas supresoras de tumores sean exportadas al citoplasma, lo que finalmente induce apoptosis ²⁴.

El selinexor (KPT-330) es un fármaco aprobado por la FDA desde junio de 2019, es capaz de inhibir de manera selectiva la exportación nuclear de proteínas mediante su unión específica y reversible al residuo de cisteína 528 de CRM1. Se cataloga como un miembro de la familia de los inhibidores selectivos del exporte nuclear (SINE); impide la unión de CRM1 con sus proteínas cargo que portan una señal de exporte nuclear (NES). Debido a estas cualidades se empleó selinexor para el presente trabajo.

Doxorrubicina

El hidrocloreuro de doxorrubicina (5,12-Naftacenodiona, 10-[(2-amino-2,3,6-tridesoxi-alfa-L-lixo-hexopiranosil)oxi]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-8-) es un antibiótico, proveniente de *Streptomyces peucetius*, este fármaco derivado de las antraciclinas es utilizado para el tratamiento oncológico, es capaz de sensibilizar células tumorales e inducir las a muerte celular, por ello es considerado un neoplásico efectivo que en combinación con otros fármacos, resulta ser una opción para el tratamiento de tumores sólidos (sarcomas, leucemia, neuroblastomas y linfomas) ¹².

El mecanismo de acción de la doxorrubicina se lleva a cabo mediante su intercalación en el ADN y la inhibición de la topoisomerasa II, esto da lugar a cambios en la cromatina, así como el impedimento del reclutamiento de la maquinaria de reparación del ADN. Por otra parte, también genera radicales libres con el consecuente daño oxidativo. De esta manera lleva a cabo rupturas en el ADN bicatenario, lo que ocurre por la unión entre la Doxorrubicina y el Proteosoma en el citoplasma, y el posterior transporte del complejo al núcleo por medio de los poros nucleares. En el núcleo, la doxorrubicina se disocia

para poder unirse ahora al ADN ya que posee una mayor afinidad por el que por el proteosoma. De esta manera, la topoisomerasa II no pueda unirse al ADN, inhibiendo la transcripción y replicación celular. Adicionalmente, la doxorubicina es capaz de interactuar con la mitocondria, interfiriendo así con el ciclo de la cadena respiratoria, generando especies reactivas de oxígeno, y también rupturas en la doble cadena de ADN³⁹.

Vía de reparación no homóloga (NHEJ)

De manera general el daño al DNA puede ocasionar cambios en la expresión genética e inducir una proliferación celular descontrolada y finalmente arresto celular. Las células dañadas pueden tomar dos caminos senescencia o apoptosis. El daño al DNA ocurre por diferentes causas, como es la acción de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS respectivamente), así como diferentes tipos de radiación ionizante y contaminantes exógenos como aminas e hidrocarburos de arilo; solo por mencionar algunos ¹⁷. La vía de reparación no homóloga es dependiente del ciclo celular y en ella participan 2 factores primordiales: la proteína 53BP1 que promueve la vía de reparación no-homóloga (NHEJ) durante la fase G₀/G₁ del ciclo celular y BRCA1 que induce la vía de reparación homóloga (HR) durante la fase S. La histona H4K20me₂ es clave para que la vía de reparación NHEJ se lleve a cabo, ya que se posiciona alrededor del corte de la doble cadena de DNA, formando una barrera que rodea la cromatina y bloquea la ligación de la doble hebra, inhibiendo así la vía HR ¹⁸. La vía de reparación no homóloga comienza con el reclutamiento del complejo MRN formado por Mre11, Rad50 y Nbs1. hacia los extremos libres que se generaron en el sitio de corte. Posteriormente el complejo reclutará a la cinasa maestra ATM en su forma dimérica (inactiva), lo que induce su autofosforilación en el residuo 1981 de serina.

Este paso ocasiona la formación de dos monómeros fosforilados de ATM (forma activa). Una vez que ATM se encuentra activa puede fosforilar a la

histona H2AX, convirtiéndose en su forma activa gamma-H2AX (γ H2AX), lo que amplifica la señal de respuesta al daño al DNAs, debido a la retroalimentación que ocurre entre ATM y γ H2AX. Enseguida, ATM fosforila a la proteína 53BP1, la cual es la encargada de inhibir la vía de reparación homóloga (HR) para que se pueda acomplejar con la proteína RIF1. RIF1 a su vez, es la responsable de inducir la vía de reparación de DNA no homóloga (NHEJ).

Una vez que se ha formado el complejo inicial de reparación se reclutan las proteínas ku70 y ku80, quien a su vez recluta a las proteínas cinasas de DNA (DNA-PKcs). Este nuevo complejo recluta y fosforila a la proteína Artemis para inducir el corte de los extremos cohesivos de ambas cadenas del DNA. Un paso posterior es el reclutamiento de la ligasa IV, XRCC4 y XLF para que se logre la religación de los extremos romos del DNA. Cabe destacar que este proceso es un mecanismo sujeto a errores, denominadas inserciones/eliminaciones (INDELS) ^{19, 20, 21,22}. **(Figs. 7 y 8)**

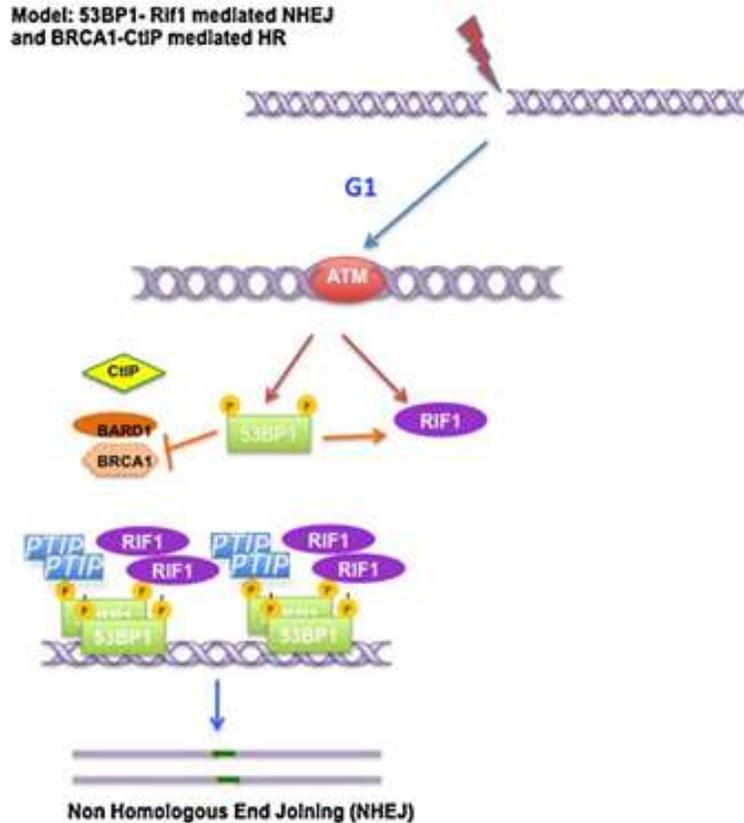


Figura 7. Mecanismo de reclutamiento de la vía no homóloga e inhibición de la vía homóloga durante la fase G1 de ciclo celular. La cinasa ATM, se encarga de fosforilar río abajo a 53BP1, el cual forma un complejo con RIF1 y PTIP para salvaguardar el sitio de corte, durante el reclutamiento del resto de las proteínas para llevar a cabo la resección del sitio dañado. A su vez, 53BP1 fosforilada inhibe la fosforilación de BRCA1 impidiendo que la vía homóloga de reparación tenga lugar. Imagen modificada de: Chit Fang Cheok et al., 2014

Respuesta de daño al DNA (DDR) en las células HGPS

La progerina ocasiona diversas alteraciones moleculares, incluyendo una morfología nuclear aberrante, la exacerbación del mecanismo de exportación nuclear de proteínas, una deficiente respuesta de daño al DNA, acortamiento telomérico y expansión nucleolar. En su conjunto, estas alteraciones inducen senescencia celular e inestabilidad genómica¹⁸.

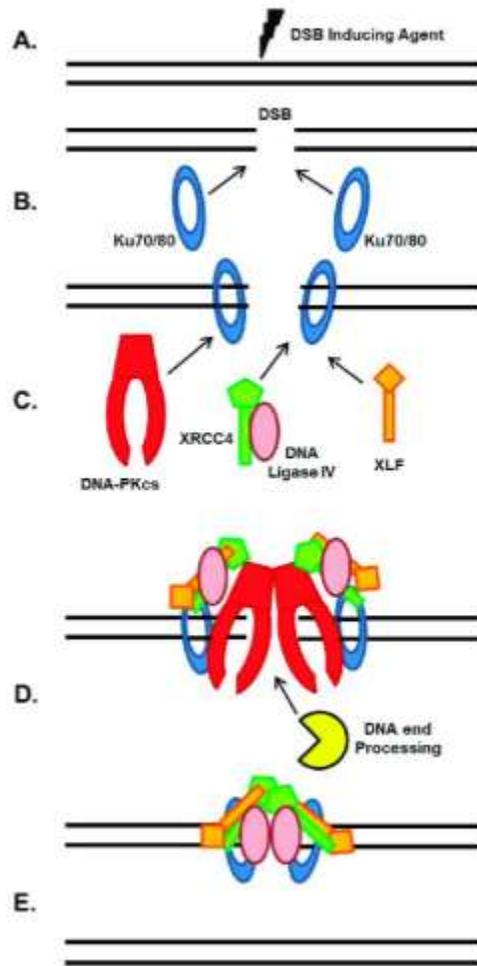


Figura 8. Mecanismo general de reparación del DNA por la vía no homóloga (NEHJ). Una vez que se lleva a cabo un corte en la doble hebra del DNA (A), el complejo Ku70/80 resguarda el sitio de corte de la doble hebra (B). (C) Se reclutan DNA-PKcs, XLF, y el complejo XRCC4/Ligasa IV y se dejan expuestos los sitios cohesivos de la ruptura en la doble hebra. (D) Los extremos expuestos son susceptibles a la degradación por endonucleasas (E) Una vez escindidos los extremos cohesivos del sitio de corte, la ligasa IV realizará la unión de los enlaces fosfodiéster mediante sus sitios catalíticos. Imagen tomada de Sishc, B., y Davis, A., 2017.

Zhang y colaboradores en 2016 reportaron que las células HGPS pierden la marca epigenética H3K9me3, lo que ocasiona una falla en la activación de la cinasa maestra ATM. Consecuentemente, ATM es incapaz de fosforilar a la histona H2AX. En su conjunto estas alteraciones generan un retraso en la respuesta de daño al DNA (DDR), lo que se hace evidente cuando se induce daño al DNA en las células HGPS mediante tratamiento con doxorrubicina. En este mismo estudio se observó que la recuperación de la marca epigenética H3K9me3 rescata la activación de ATM, y por ende, la fosforilación de la histona H2AX (γ H2AX). La consecuencia final es el correcto reclutamiento de la maquinaria de reparación del DNA, mediante el reclutamiento de 53BP1, factor involucrado en la activación de la vía NHEJ durante la fase G0/G1 del ciclo celular (**Figs. 9 y 10**)²³.

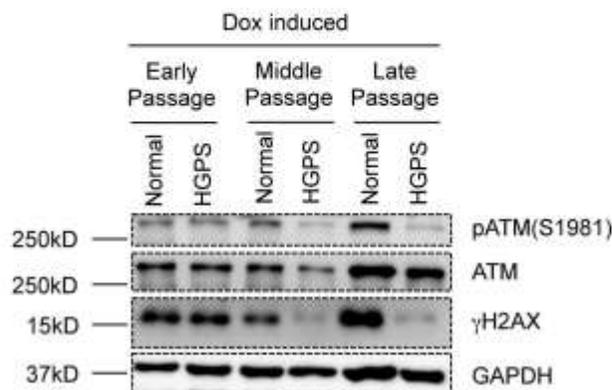


Figura 9. Deficiente respuesta de daño al DNA en las células HGPS. Se puede observar en los experimentos de Western Blot, que los niveles de pATM y γ H2AX son bajos en los pasajes tardíos de las células HGPS, con respecto a las células normales, indicando una falla en la activación de pATM y γ H2AX, las cuales están involucradas en el reclutamiento de la maquinaria de respuesta de daño al DNA. Se utilizó doxorrubicina como inductor de la respuesta de daño al DNA. Tomado de Zhang et. al., 2016.

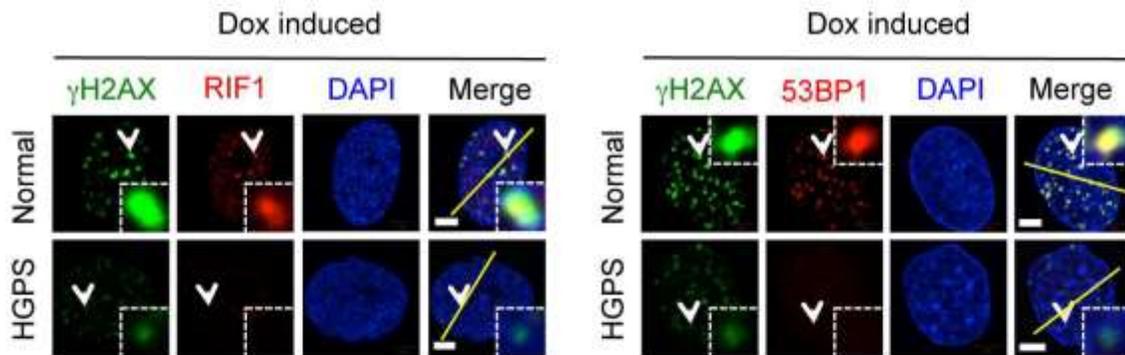


Figura 10 Las células HGPS tienen un retraso para reclutar la maquinaria de respuesta de daño al ADN después de la inducción con doxorubicina. En las células HGPS se observa un nivel bajo de fluorescencia para γ H2AX 53BP1 y RIF1, en comparación con las células normales. Tomado de Zhang et. al., 2016.

Antecedentes

Aumento de la exportación nuclear y deslocalización de proteínas en los fibroblastos HGPS

Se sabe que la exportación nuclear es dependiente de la exportina CRM1, la cual reconoce sus proteínas blanco para transportarlas del núcleo hacia el citoplasma. Las proteínas cargo deben contener una secuencia/señal de exportación nuclear (NES) para unirse a CRM1. La exportación nuclear también requiere la acción de RanGTP para que el complejo CRM1-proteína blanco pase a través de los poros nucleares. Nuestro grupo de trabajo reportó recientemente que los fibroblastos de pacientes con HGPS tienen un nivel elevado de CRM1, lo que ocasiona la exportación nuclear exacerbada de proteínas¹⁴. De manera importante, la modulación farmacológica de la actividad de CRM1, utilizando un inhibidor específico de CRM1 llamado el fármaco llamado leptomicina B (LMB), aminoró significativamente las marcas

de senescencia de los fibroblastos de pacientes con HGPS, a través de la relocalización de proteínas nucleares (**Figura 11**)^{22,23}.

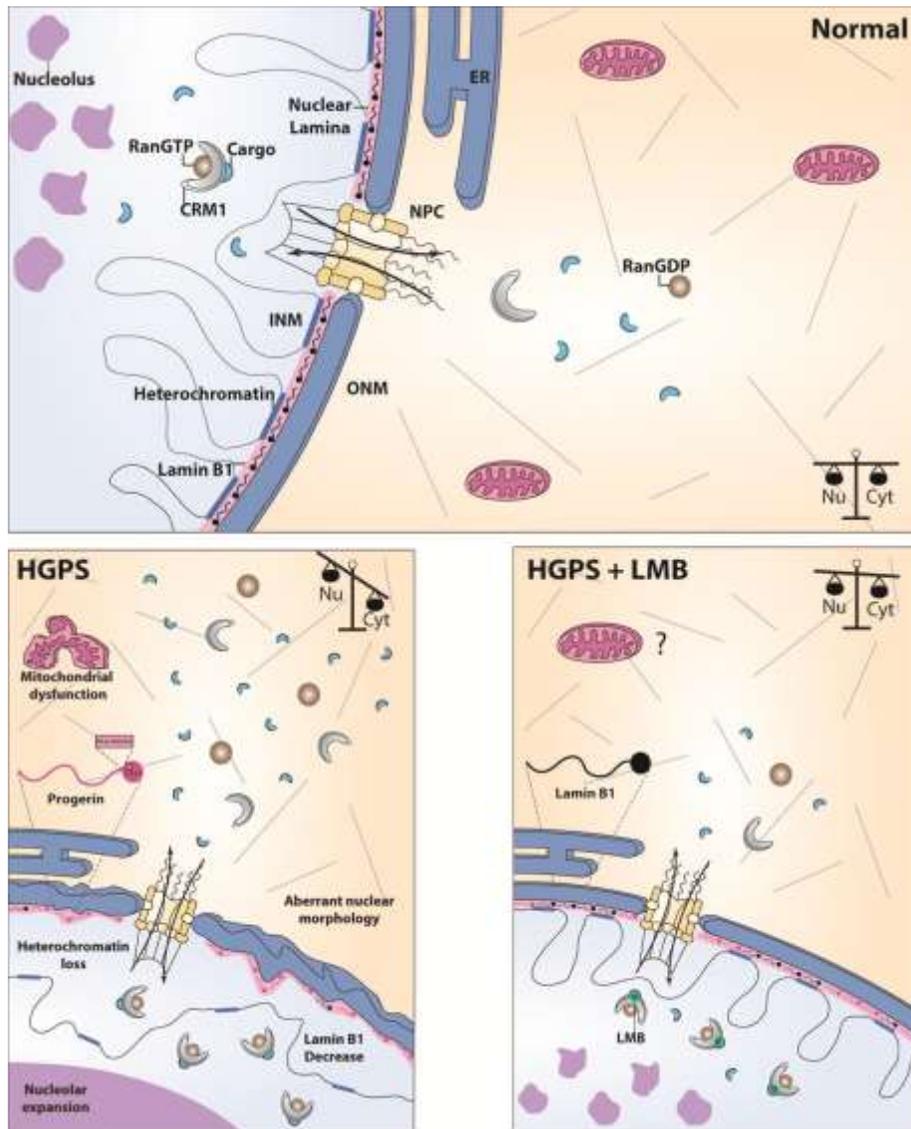


Figura 11. Exportación nuclear exacerbada en los fibroblastos HGPS. Debido a la sobreexpresión de CRM1 se presenta una deslocalización de proteínas nucleares hacia el citoplasma y la consecuente aparición de marcas celulares de senescencia (HGPS). La administración de leptomicina B (inhibidor selectivo de CRM-1) normaliza la exportación nuclear y disminuye las marcas de senescencia (HGPS+LMB). Imagen tomada de: Bulmaro Cisneros e Ian García-Aguirre, 2020.

En el grupo de trabajo se ha utilizado otro inhibidor selectivo de CRM1 llamado selinexor (**Figura 6**), este fármaco tiene propiedades farmacológicas superiores y menor citotoxicidad, en comparación con LMB. Además, tiene la capacidad de disminuir los niveles de CRM1 y progerina (**Figura 12**).

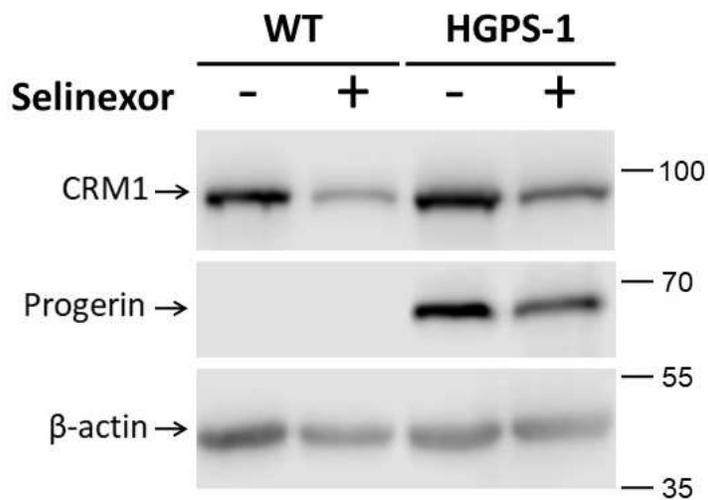


Figura 12. El selinexor reduce los niveles de CRM1 y progerina en los fibroblastos HGPS. Los lisados de cultivos celulares previamente tratados con selinexor o con el vehículo solamente se analizaron mediante Western Blot, utilizando anticuerpos dirigidos contra CRM1, y actina (control de carga). Resultados no publicados del D. en C. Ian Alain García Aguirre.

El selinexor se desarrolló para el tratamiento de mieloma múltiple, en donde provoca la acumulación nuclear de diferentes oncoproteínas y proteínas supresoras de tumores, lo que finalmente induce apoptosis ²⁴. El selinexor (KPT-330) es un fármaco aprobado por la FDA en junio de 2019; es capaz de inhibir de manera selectiva la exportación nuclear de proteínas mediante su unión específica y reversible al residuo 528 (cisteína) de CRM1, con lo que se cataloga como un miembro de la familia de inhibidores selectivos de la exportación nuclear de proteínas (SINE). La unión de selinexor a CRM1 impide el reconocimiento de proteínas cargo que portan una señal de exporte nuclear (NES).

De manera interesante, la administración de selinexor por 6 días a los fibroblastos HGPS recuperó los niveles de H3K9me3, mientras que el tratamiento por 3 días resultó en una disminución de las especies reactivas de oxígeno (**Figuras 12 y 13**). Tomando en consideración la función de la histona H3K9me3 en la vía no homóloga de reparación del DNA (NHEJ) así como la disminución de especies reactivas de oxígeno, es posible que el tratamiento con selinexor mejore la respuesta de daño al ADN en los fibroblastos HGPS.

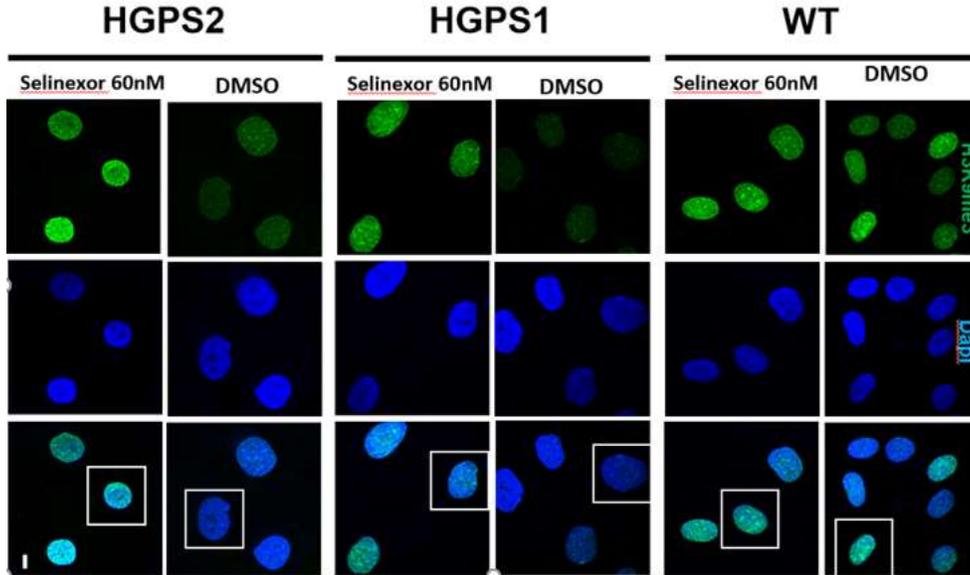


Figura 13. El tratamiento con selinexor recuperó la marca de heterocromatina H3K9m3. Después de un tratamiento con Selinexor durante 6 días, los niveles de la histona h3K9m3 se recuperó en los fibroblastos HGPS. Imagen proporcionada por M.C. Luz Adriana Soto Ponce.

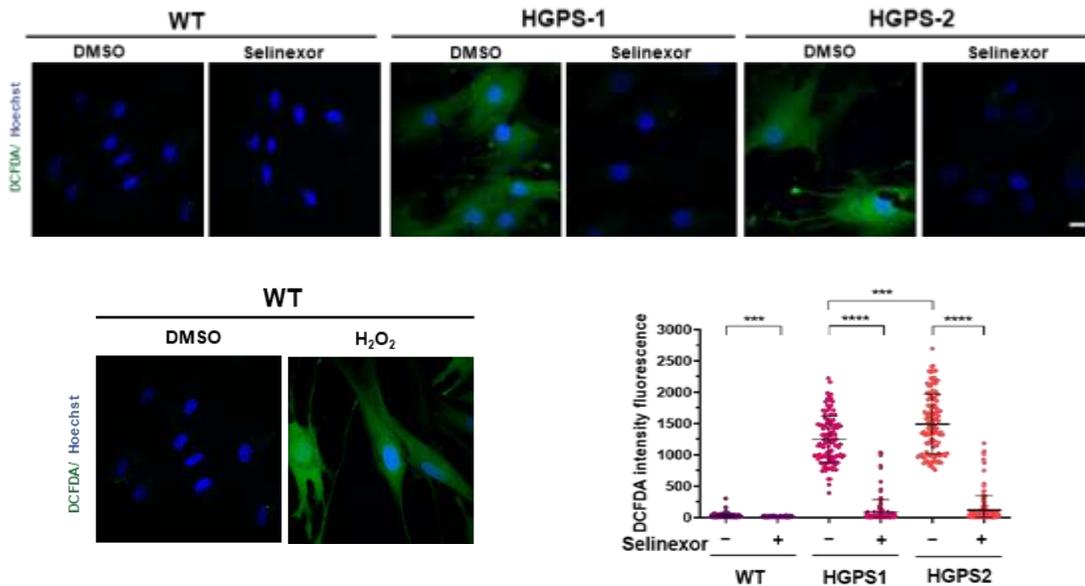


Figura 14. El tratamiento con selinexor disminuyó las especies reactivas de oxígeno en los fibroblastos HGPS. El tratamiento con selinexor fue durante 3 días. Se utilizó el kit DCFDA / H2DCFDA que mide las especies reactivas de oxígeno a nivel celular. Se muestra la inducción de especies reactivas mediante tratamiento de fibroblastos WT con H₂O₂ (control positivo). La intensidad de fluorescencia se observó por medio de microscopia confocal. Imagen proporcionada por la M.C. Luz Adriana Soto Ponce.

Justificación

Los fibroblastos de pacientes con HGPS presentan una falla en la respuesta de daño al DNA, lo que ocasiona inestabilidad genómica. De manera importante, nuestro laboratorio observó que el tratamiento con selinexor de los fibroblastos de pacientes con HGPS induce la degradación de progerina, disminuye las ROS y recupera el nivel de la marca epigenética H3K9me3. Por lo tanto, consideramos relevante analizar el efecto del selinexor sobre la respuesta de daño al DNA en los fibroblastos HGPS.

Objetivos

Generales

Analizar el efecto del selinexor sobre el mecanismo de reparación DDR en fibroblastos de pacientes con progeria.

Particulares

1. Analizar comparativamente la respuesta de daño al DNA de los fibroblastos WT y HGPS tratados con el inductor de daño al DNA doxorubicina.
2. Analizar el efecto del selinexor sobre la respuesta de daño al DNA de los fibroblastos HGPS tratados con el inductor de daño al DNA doxorubicina.

Hipótesis

El tratamiento con selinexor mejorará la respuesta del daño al ADN que se encuentra alterada en las células de pacientes con HGPS, por medio de la disminución del nivel de progerina y la relocalización nuclear de ATM.

Estrategia experimental

En la **figura 16** se muestra un diagrama de flujo que ilustra la estrategia general del proyecto. Se planteó el análisis comparativo de la respuesta del daño al DNA (DDR) en cultivos de fibroblastos primarios provenientes de un individuo aparentemente saludable y de dos pacientes con HGPS. Los cultivos fueron tratados con doxorubicina para inducir cortes en la doble cadena (DSB) del ADN, lo que nos permitió analizar la respuesta de daño al DNA. Para analizar este proceso celular se monitoreó el nivel y la localización subcelular de la cinasa ATM (*Ataxia-telangiectasia mutated*; cinasa maestra que dirige el mecanismo de reparación del ADN) y de la histona γ H2AX (marcador de reparación de ADN) por medio de ensayos de inmunodetección en fase sólida y de inmunofluorescencia indirecta. Los cultivos de fibroblastos se trataron con el mutágeno doxorubicina para encender el mecanismo de reparación de ADN. En la segunda parte del estudio se analizó el efecto del selinexor sobre el mecanismo de reparación de daño al ADN en los fibroblastos HGPS, utilizando las técnicas mencionadas anteriormente.

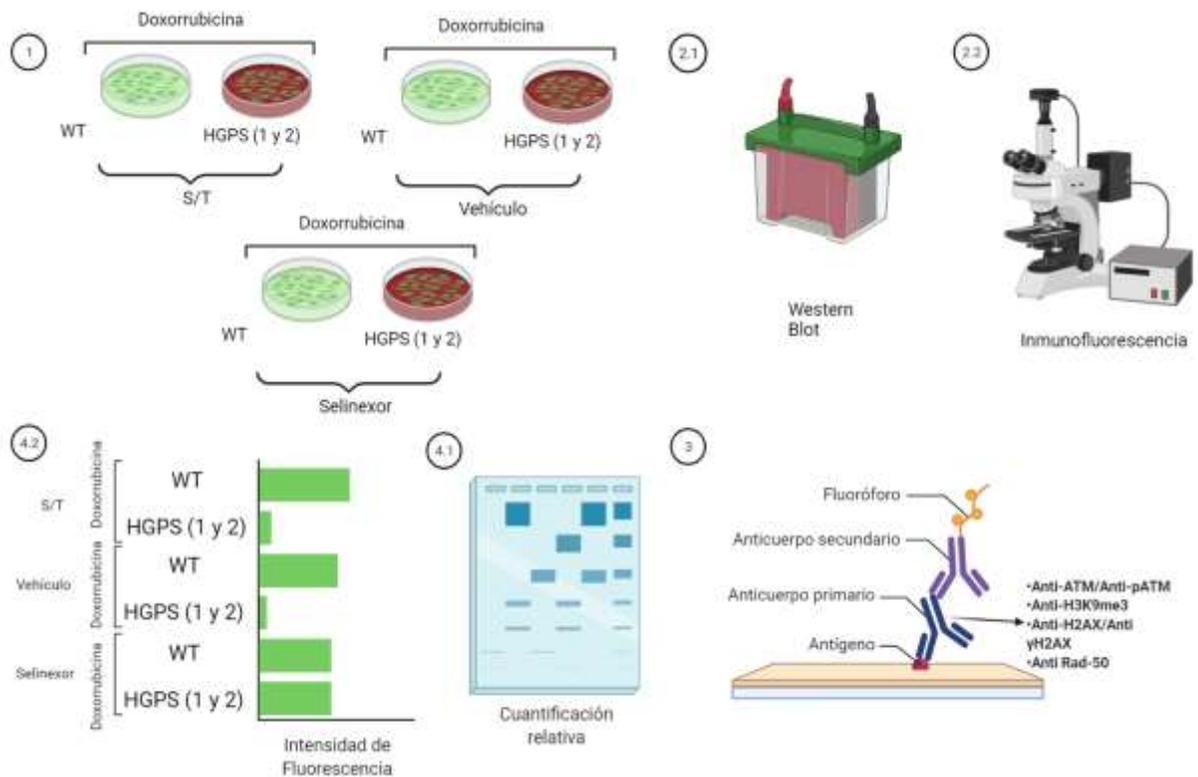


Figura 15 Estrategia experimental general

Materiales y métodos

Modelo de estudio

Se emplearon fibroblastos primarios provenientes de un individuo aparentemente sano y de dos pacientes con HGPS. Los cultivos primarios fueron adquiridos del instituto para la investigación médica Coriell, New Jersey EE. UU. Las características generales de los fibroblastos se muestran en la **Tabla 1**).

Tabla 1 Generalidades de los cultivos primarios que se utilizarán en este trabajo.

Código de Cultivo	Fenotipo	Edad	Sexo	Procedencia
GM03440	WT	20	Masculino	Piel de un pierna
AG11513	HGPS 1	8	Femenino	Piel de una pierna

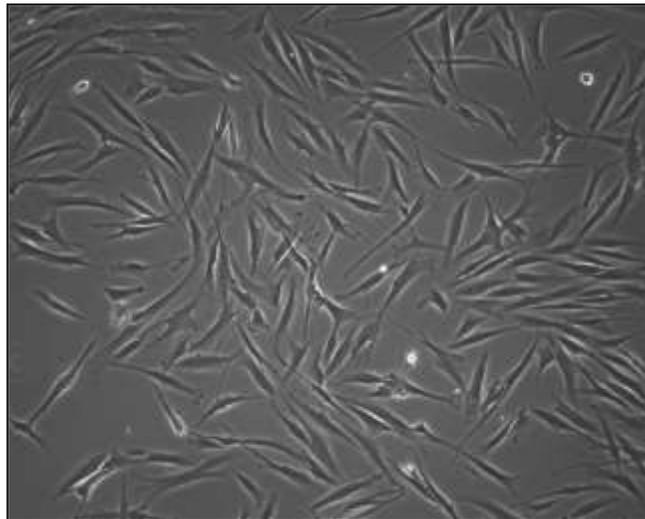


Figura 16. Imagen de fibroblastos de un individuo aparentemente saludable. Instituto Coriell, New Jersey, EE. UU.

Cultivo celular

Se emplearon cultivos de fibroblastos primarios de un individuo aparentemente sano (GM03440) y de individuo con HGPS (AG115133), provenientes del instituto Coriell. Los cultivos fueron mantenidos y expandidos en medio esencial mínimo (MEM) suplementado con aminoácidos y 10% de suero fetal bovino. Para su crecimiento se empleó una incubadora con suministro de CO₂ al 5% y una temperatura de 37°. Para expandir los cultivos primarios se lavaron 3 veces de manera suave con PBS a temperatura ambiente y posteriormente se retiró el PBS y se añadió tripsina diluida 1:3 en PBS por un lapso de 30-45 segundos para hidrolizar los enlaces peptídicos y obtener el cultivo en suspensión. Por último, se añadió medio (MEM) para inactivar la tripsina y homogenizar el cultivo en suspensión para verterlo sobre cajas Petri. El medio de cultivo se cambió dos veces por semana y los experimentos se realizaron cuando los cultivos alcanzaron una confluencia del 55-65%. Cuando se indica los cultivos celulares se trataron con 1 µM de doxorubicina diluida en DMSO (0.03% de DMSO concentración final). Se utilizó una solución madre de 74.95 µM de doxorubicina disuelta en DMSO). La inducción de daño al ADN se realizó durante 2 horas, y posteriormente las células se lavaron 3 veces con PBS, se les añadió medio nuevo y se les dejó en recuperación en la incubadora de CO₂, durante 30 minutos, previo a su procesamiento para los experimentos de Inmunofluorescencia o Western Blot. El tratamiento con 60 nM de selinexor diluido en DMSO se realizó durante 72 h, añadiendo fármaco nuevo a las 48 h. Cuando se llevaron a cabo tratamientos combinados (doxorubicina/selinexor), los cultivos se trataron primero con selinexor por 72 h y posteriormente con doxorubicina por 2 h.

Fármacos utilizados

Para el presente trabajo se emplearon 2 fármacos para realizar los tratamientos, que se muestran en la **tabla 2**.

Tabla 2 Fármacos empleados, incluyendo disolvente y concentraciones utilizadas.

Fármaco	Diluyente	Concentración final
Doxorrubicina	DMSO	1 μ M
Selinexor	DMSO	60 nM

Tratamientos

Doxorrubicina:

El tratamiento con Doxorrubicina se realizó empleando como vehículo DMSO diluido en agua inyectable, y para el caso de Doxorrubicina se emplearon alícuotas a una concentración de 74.95 μ M disueltas en DMSO. El DMSO final quedo a un porcentaje de 0.03% en el cultivo. La concentración final de Doxorrubicina en el cultivo fue de 1 μ M. La inducción de daño se realizó retirando el medio y realizando un lavado suave con PBS (3 veces), y adicionando medio fresco con Doxorrubicina 1 μ M o el vehículo solamente durante 2 horas. Posteriormente las células se lavaron 3 veces con PBS y se les añadió medio nuevo (MEM), se les dejó en recuperación en la incubadora a 37° con 5% de CO₂ durante 30 minutos. Enseguida se fijaron y se visualizaron por ensayos de Inmunofluorescencia. O se utilizaron para la extracción de proteínas y ensayos de Western Blot.

Selinexor:

Se emplearon alícuotas de selinexor de 100 μ M para llegar a una concentración final de 60 nM en el cultivo celular, y 0.06% de DMSO. El tratamiento se realizó durante 72 horas, haciendo el cambio de medio con selinexor cada 48 horas.

Tratamiento combinado:

Una vez realizado el tratamiento con Selinexor, se realizó la inducción del daño con Doxorubicina.

Anticuerpos

Para los experimentos de inmunofluorescencia indirecta se emplearon los siguientes anticuerpos: anticuerpo monoclonal de ratón anti- γ H2AX (Ser139) 1:500 (05-636, Millipore) y anticuerpo monoclonal de conejo anti pATM (Ser1981) 1:200. Para los ensayos de Western blot se emplearon los siguientes anticuerpos: anticuerpo monoclonal de ratón anti- γ H2AX (Ser139) 1:1500 (05-636, Millipore), anticuerpo monoclonal de conejo anti-pATM (Ser1981) 1:5000 (ab81292, Abcam), anticuerpo monoclonal de ratón anti-ATM 1:2000 (aa2250-3100; Abcam) y anticuerpo monoclonal de ratón anti-progerina 1:300 (sc-81611; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA).

Inmunofluorescencia indirecta acoplada con microscopia confocal

Las células se sembraron sobre cubreobjetos y cuando alcanzaron una confluencia de 70-80% se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos. Enseguida las preparaciones se lavaron dos veces con PBS y se permeabilizaron y bloquearon durante 10 minutos con la solución amortiguadora IF [10 mg/mL BSA, 0.1 % Tritón X-100 y 0.2 % SDS]. Posteriormente los cubreobjetos se lavaron con PBS dos veces y con agua miliQ entre cada lavado con PBS, y se dejaron secar para añadir el anticuerpo

primario y dejarlo incubando toda la noche a 4°C. Enseguida se realizó un lavado con PBS por 5 minutos en agitación constante y dos lavados con PBS y agua miliQ sin agitación, y se dejaron las preparaciones para incubarlas con el anticuerpo secundario a temperatura ambiente durante 1 h en oscuridad y condiciones húmedas. Finalmente se repitieron los lavados con PBS 3 veces sin agitación y se permitió el secado de las preparaciones. Se tiñeron los núcleos incubando las preparaciones durante 10 minutos con una dilución 1:500 de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y llevando a cabo lavados posteriores con PBS. Cuando se indica las células se tiñeron durante 10 minutos con faloidina rodaminada (dilución 1:150 en PBS) para decorar el citoesqueleto. Después de lavar las células con PBS y permitir el secado de los cubreobjetos, se les añadió una gota de VECTASHIELD (fotoprotector) para preservar la fluorescencia, y se sellaron con barniz de uñas. Las muestras se preservaron a 4° en la oscuridad hasta su visualización en un microscopio confocal invertido.

Extracción de proteínas totales y ensayos de Western Blot

A partir de una caja Petri de 100 mm que contenía un cultivo de fibroblastos a una confluencia del 80%, se retiró el medio de cultivo y se añadió 1 mL de PBS 1x frío; enseguida se recolectaron las células con un gendarme y se transfirieron a tubos cónicos de 1.5 mL. Posteriormente se añadió la solución amortiguadora de lisis RIPA (NaCl 150mM, Tritón 1%, Tris-HCl pH:8 50mM, SDS 0.1%, Desoxicolato de sodio 0.5%), ortovanadato de sodio, fluoruro de sodio, Complete 1x y PMSF 1x. Se homogenizó la pastilla celular suavemente y se dejó reposar 5 minutos en hielo. Enseguida, los preparados celulares se sometieron a sonicación para obtener los lisados de proteínas totales, empleando pulsos de 15 segundos a 3.5 micrones y 30 segundos de reposo, repitiéndose este proceso 3 veces. El lisado celular se centrifugó a 10'000 r.p.m. durante 4 minutos a 4°, se recuperó el sobrenadante evitando su

contaminación con restos celulares y se procedió con la cuantificación de proteínas por el método de Bradford, midiendo la absorbancia a 595 nm en un lector de microplacas. Se procedió con los ensayos de inmunodetección en fase sólida mediante electroforesis en geles de acrilamida con SDS (SDS-PAGE) usando una corriente de 100 volts. Una vez terminada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa utilizando la solución amortiguadora de transferencia 1x (Tris-glicina 1x con 20% metanol), una cámara para transferencia semi-húmeda y una corriente de 20 V. El tiempo de transferencia varió en función del peso molecular de la proteína de interés. Posterior a la transferencia, la membrana se tiñó con rojo de Ponceau para verificar la eficacia del proceso y después de lavar con Tris-Salino-Tween-20 (TBST 1x), la membrana se bloqueó durante 1 h a temperatura ambiente en TBST 1x con leche baja en grasa al 5%. Enseguida se incubó la membrana con el anticuerpo primario a 4° toda la noche con en agitación suave y constante y posteriormente se lavó 3 veces con TBST 1x y se incubó con el anticuerpo secundario durante 1 hr a temperatura ambiente en agitación constante. Por último, se realizaron 3 lavados de la membrana con TBST 1x y se procedió con el revelado empleando la solución de quimioluminiscencia basada en luminol (ECL) por 12 minutos y el scanner C-Digit Blot-Scanner. Posteriormente se realiza la incubación con un anticuerpo contra β -actina para normalizar los niveles relativos de la proteína de interés.

Resultados

La respuesta de daño al ADN está alterada en los fibroblastos HGPS

Con la finalidad de evaluar la respuesta de daño al ADN (DDR) en los fibroblastos WT y HGPS, se realizaron cortes en la doble cadena de ADN por medio del tratamiento con Doxorrubicina y los resultados se evaluaron mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta y microscopia confocal. Llevamos a cabo la inmunofluorescencia de γ H2AX para monitorear la respuesta celular en respuesta al daño al ADN. Observamos la aparición de focos de γ H2AX después del tratamiento con Doxorrubicina, tanto en los cultivos WT como los cultivos HGPS. Sin embargo, el número e intensidad de los focos de γ H2AX fue significativamente mayor en las células WT con respecto a las células HGPS (Fig. 17-20). Estos resultados sugieren que la respuesta del daño al ADN evaluada mediante la activación de γ H2AX, se encuentra alterada en los fibroblastos HGPS.

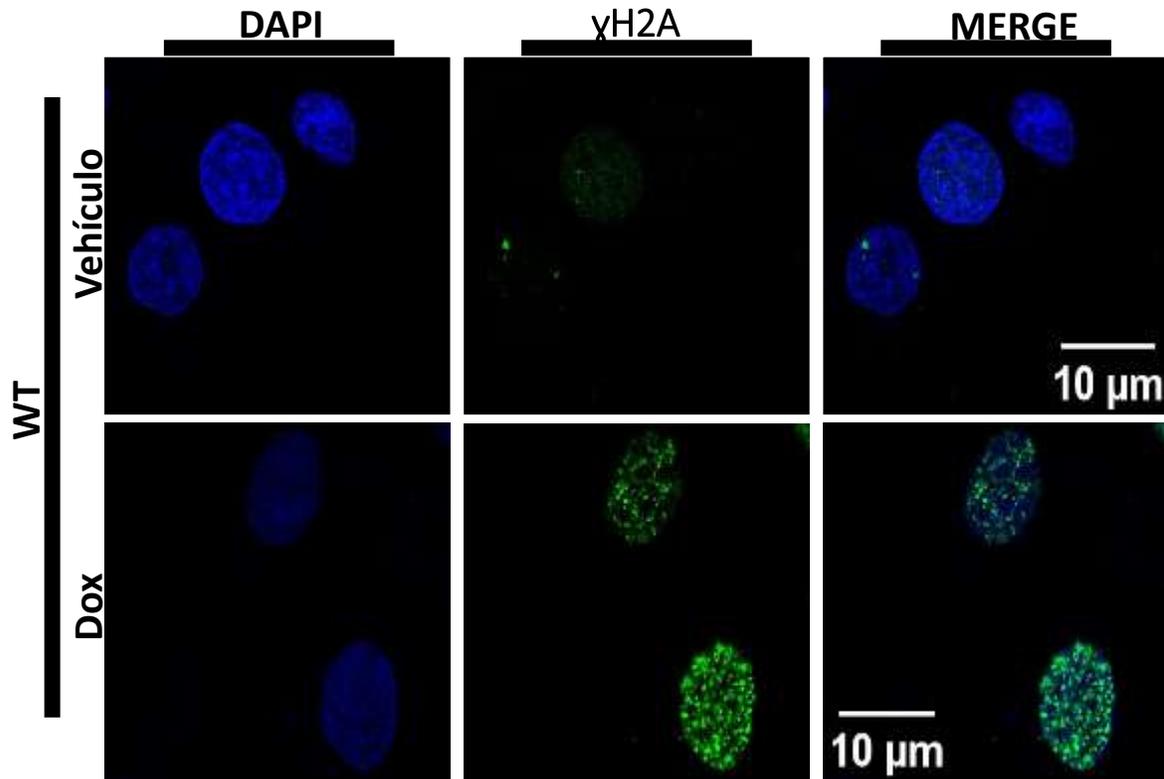


Figura 17. El tratamiento con Doxorrubicina indujo la fosforilación de la histona H2AX en los cultivos WT. Las células se trataron con Doxorrubicina 1uM o el vehículo solamente, y transcurridas 2 horas y 30 minutos de recuperación se visualizaron por microscopia confocal.

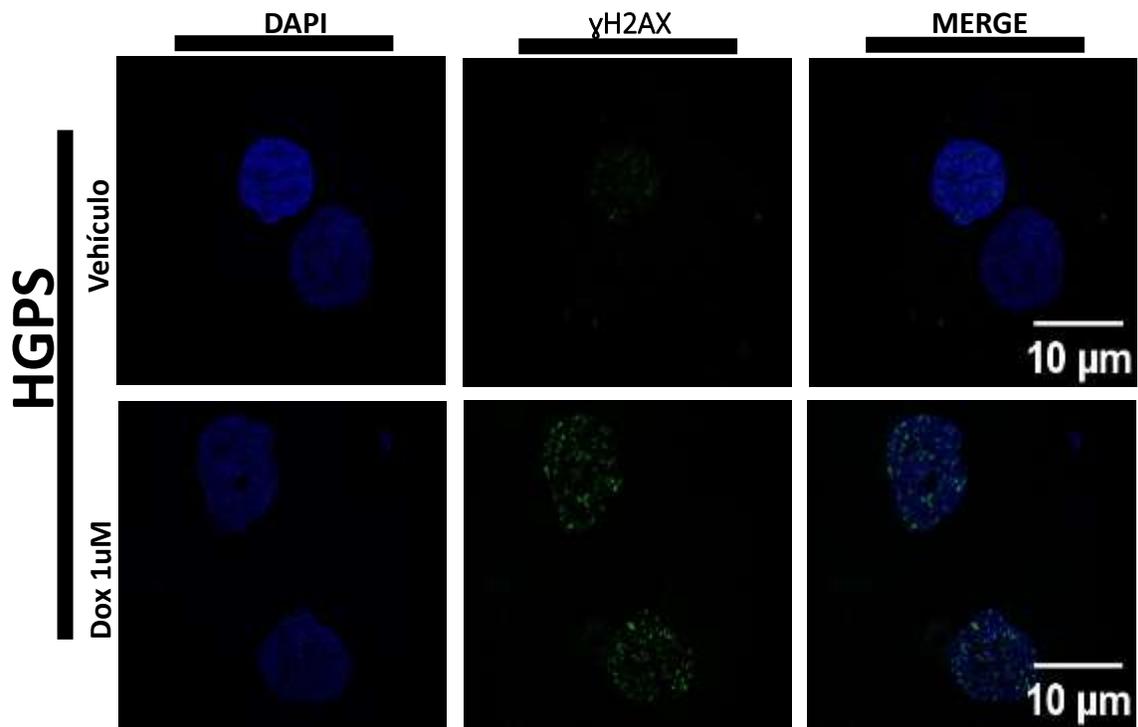


Figura 18. El tratamiento con Doxorubicina indujo la fosforilación de la histona γ H2AX en los cultivos HGPS. Las células se trataron con Doxorubicina 1 μ M o el vehículo solamente durante dos horas y después de retirar el mutágeno se dejaron reposar los cultivos por 30 minutos y se procedió con el ensayo inmunofluorescencia y análisis por microscopía confocal.

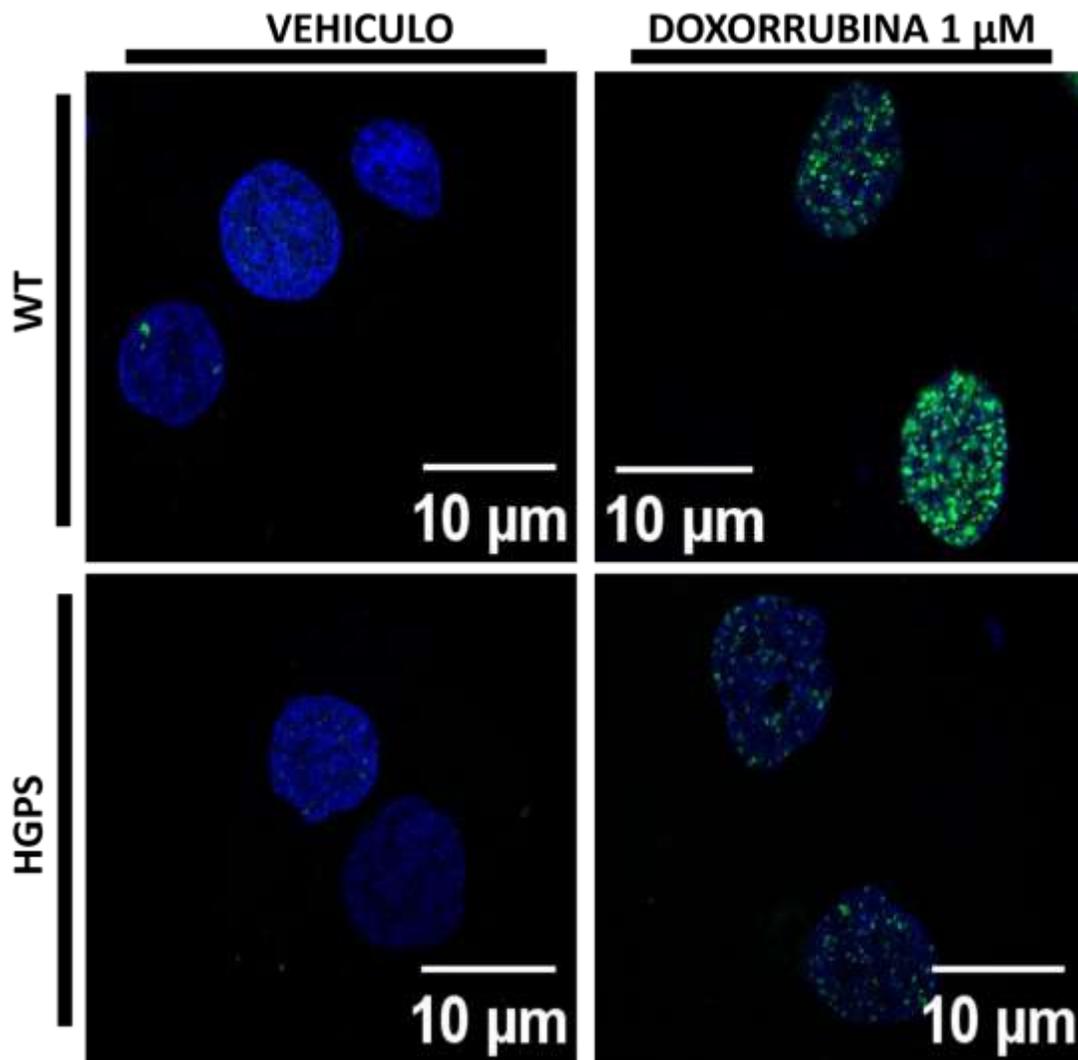
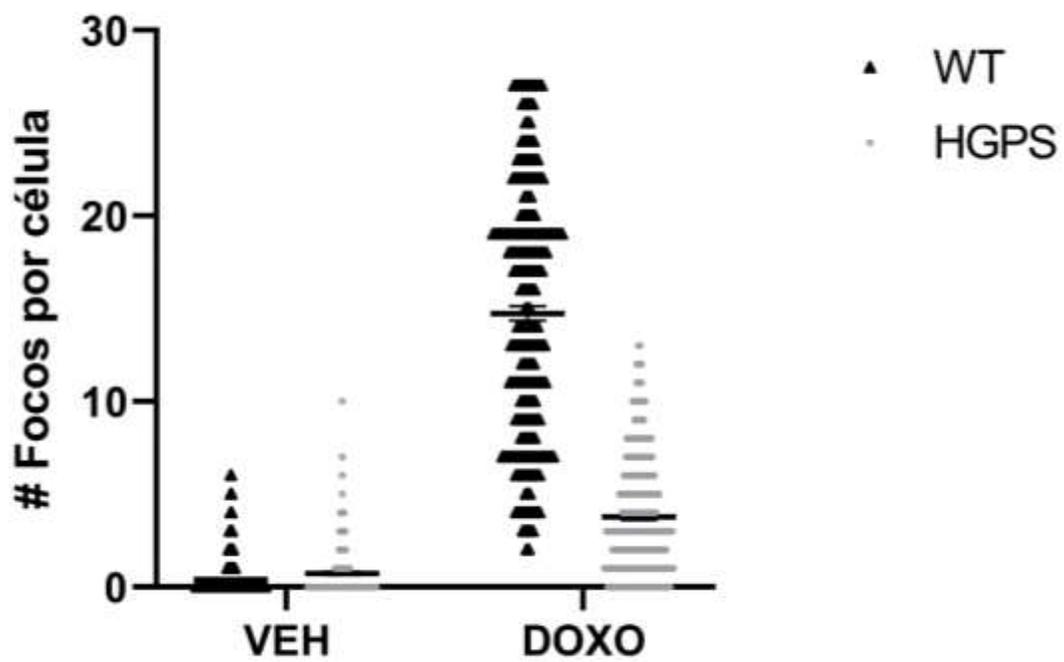


Figura 19. Análisis comparativo de la inducción de γ H2AX entre el cultivo WT y el cultivo HGPS. Se evidencia la respuesta alterada del cultivo HGPS ante la inducción de daño al ADN en las imágenes de microscopía confocal.



*n=300 células, de 3 experimentos

Figura 20. Análisis cuantitativo de la cantidad de focos de γ H2AX entre los cultivos WT y HGPS.

Análisis de los niveles relativos de la histona γ H2AX por inmunodetección en fase sólida

Se llevo a cabo la inmunodetección en fase sólida de la histona γ H2AX en los cultivos de fibroblastos WT y HGPS sometidos a daño al ADN mediante tratamiento con Doxorubicina. Como se puede apreciar en la **Figuras 21 y 22**, la cantidad de la histona γ H2AX es significativamente menor en el cultivo HGPS, en comparación con el cultivo WT.

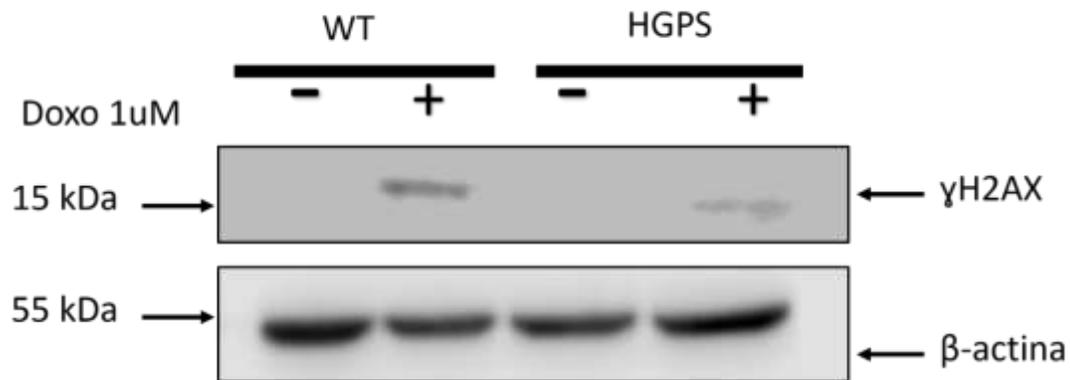
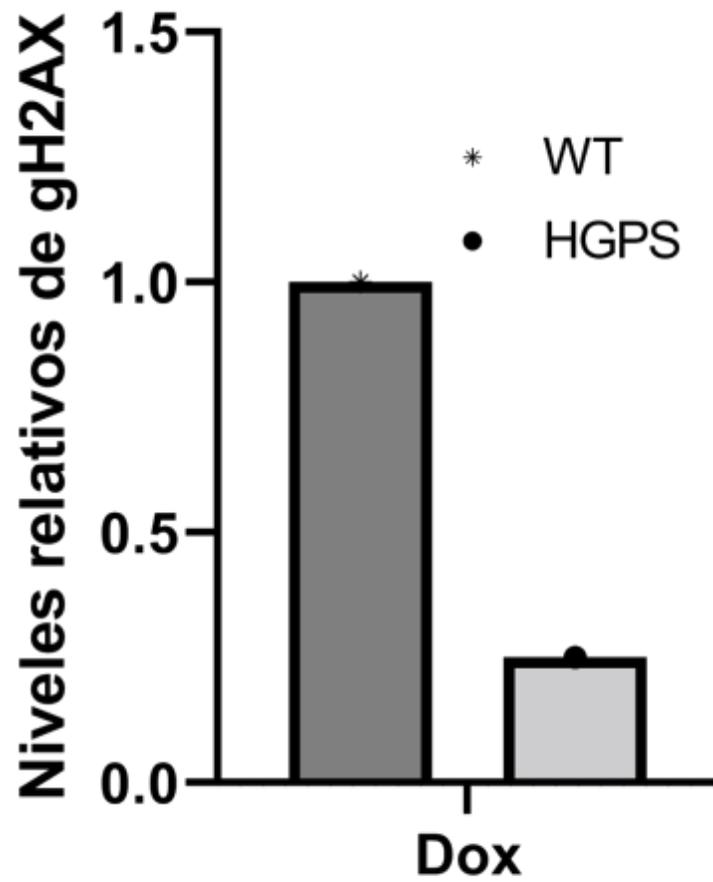


Figura 21. Los fibroblastos HGPS presentan una menor activación de la histona γ H2AX después del tratamiento con Doxorubicina. Los cultivos WT y HGPS se sometieron a daño genético con Doxorubicina y posteriormente se sometieron a ensayos de inmunodetección en fase sólida usando anticuerpos contra γ H2AX y β -actina (control de carga).



*Resultados de 2 experimentos independientes.

Figura 22. Cuantificación de γ H2AX en los fibroblastos WT y HGPS después de la inducción de daño al ADN con Doxorubicina. Se utilizó β -actina como control de carga.

Activación de la cinasa ATM durante la respuesta de daño al ADN

Debido a que ATM es la cinasa encargada de la fosforilación de la histona H2AX, procedimos a analizar su localización subcelular y niveles, utilizando anticuerpos que identifican su forma fosforilada (pATM). Como se puede observar en las Figuras 23 y 24, la señal fluorescente de pATM se incrementó después del tratamiento con Doxorrubicina en ambos cultivos, WT y HGPS.

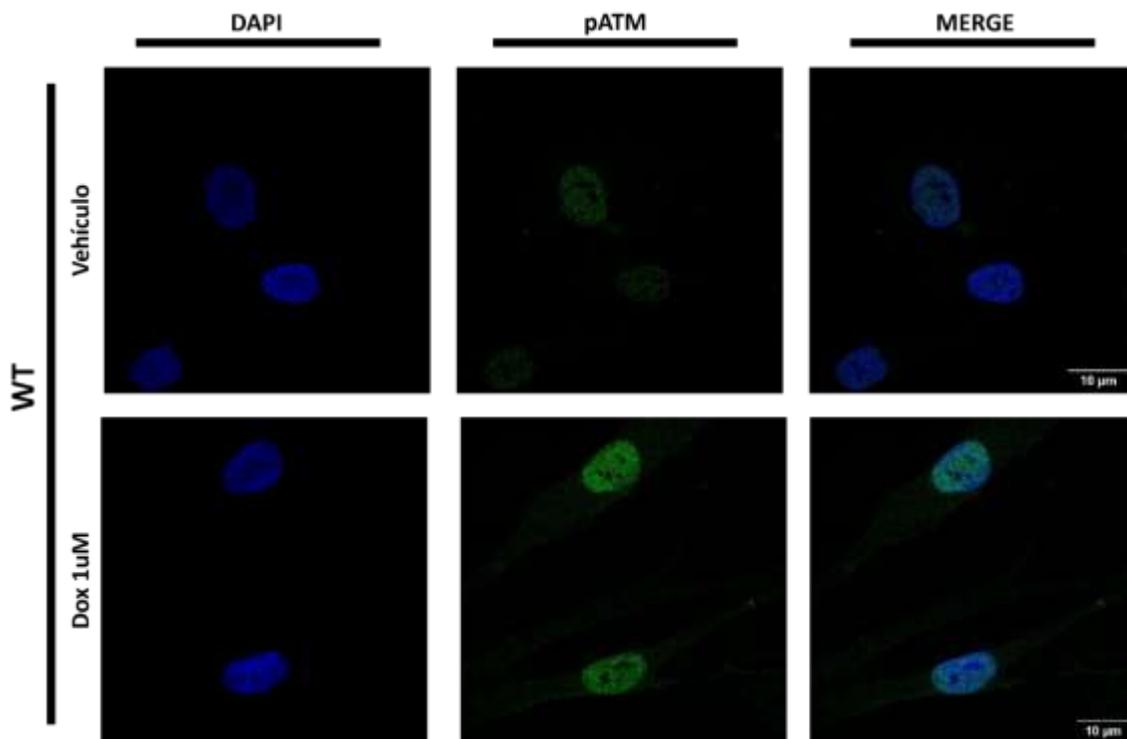


Figura 23. La señal nuclear de pATM se incrementó en los fibroblastos WT después del tratamiento con Doxorrubicina (1 μM). Se muestran imágenes representativas de microscopía confocal.

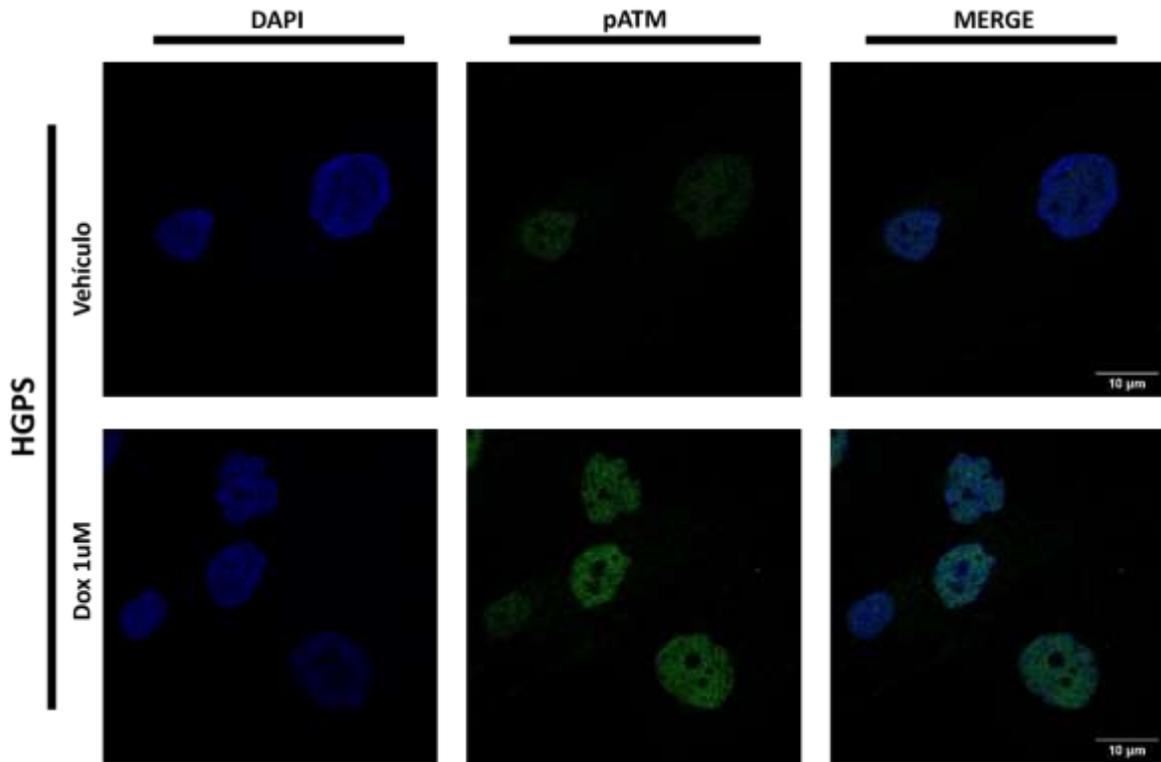


Figura 24. La señal nuclear de pATM se incrementó en los fibroblastos HGPS después del tratamiento con Doxorubicina. Se muestran imágenes representativas de microscopía confocal.

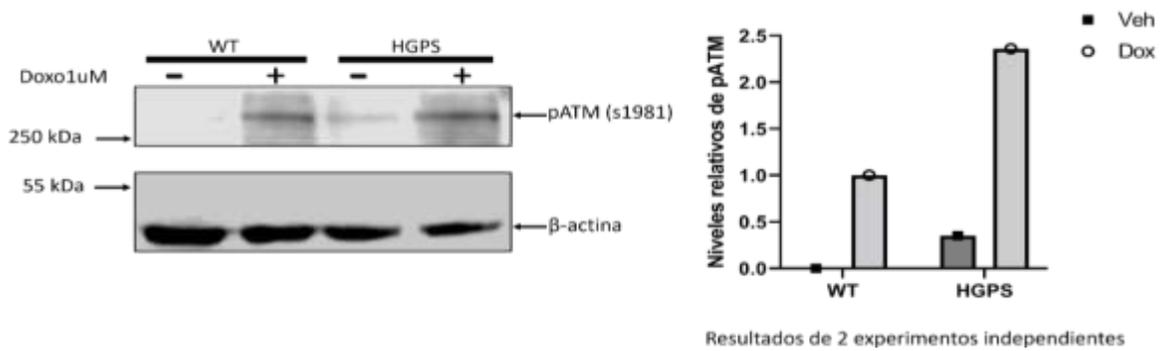


Figura 25. El nivel de la cinasa ATM fosforilada es mayor en los fibroblastos HGPS. Los cultivos WT y HGPS se trataron con Doxorubicina y posteriormente se sometieron a ensayos de inmunodetección en fase sólida.

Con la finalidad de analizar si el selinexor mejora la respuesta de daño al ADN en los fibroblastos HGPS, se llevó a cabo un tratamiento conjunto, donde primero se trataron los cultivos WT y HGPS con selinexor durante 72 horas y posteriormente se indujo daño al ADN con Doxorubicina. Como se observa en las **Figuras 26, 27 y 28**, los focos de γ H2AX disminuyen en los fibroblastos WT tratados previamente con selinexor, mientras que en el caso del cultivo HGPS tratado con selinexor los focos de γ H2AX aumentaron. Consistentemente, el análisis de estos experimentos mediante inmunodetección en fase sólida indican que el contenido de γ H2AX disminuyó en los fibroblastos WT tratados con selinexor, mientras que en los fibroblastos HGPS tratados con selinexor el nivel de la histona fosforilada fue mayor comparativamente (Fig. 29). Por lo que respecta a la cinasa ATM, la señal fluorescente que corresponde a la cinasa fosforilada se acumula en el núcleo. pero esta localización subcelular no sufre algún cambio significativo por el tratamiento con selinexor (**Fig. 30-32**),

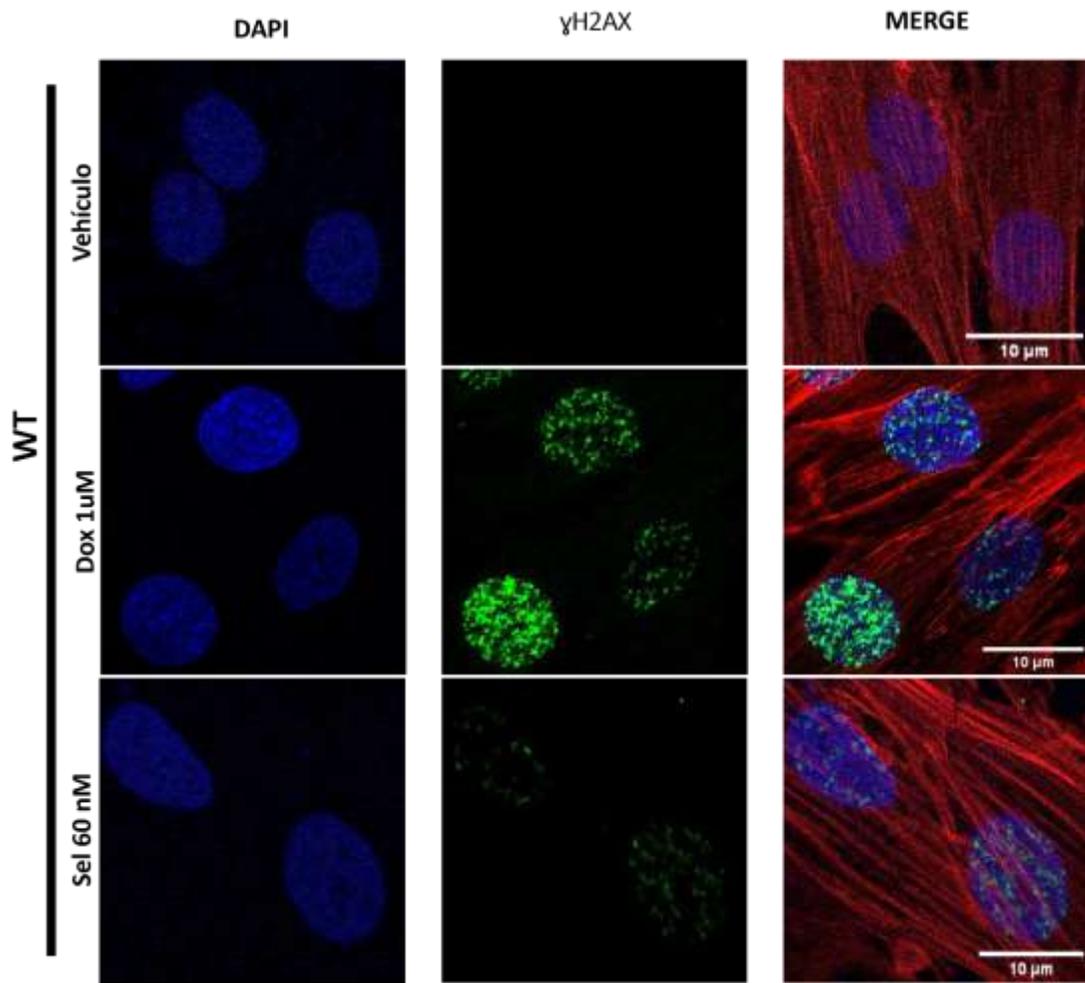


Figura 26 El tratamiento con selinexor disminuyó la activación de γ H2AX en los fibroblastos WT.

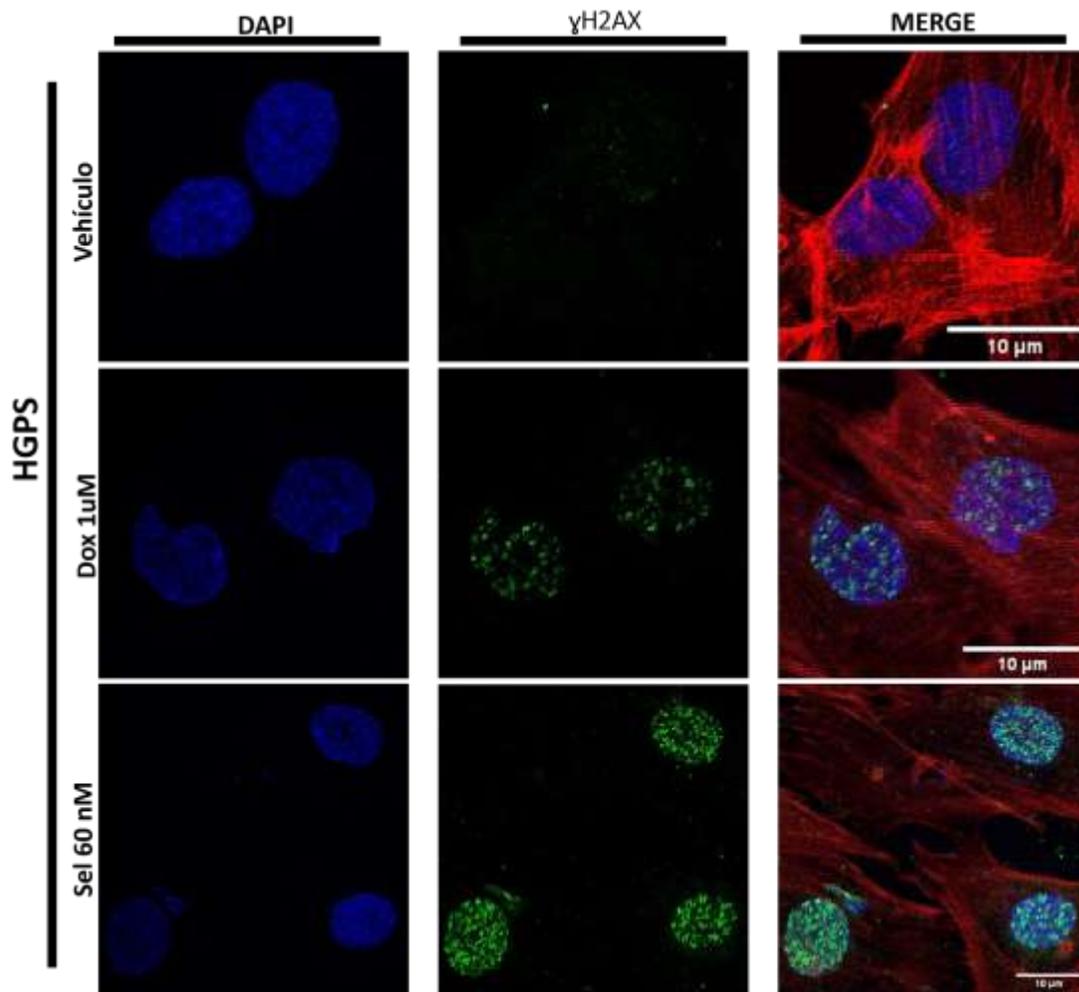


Figura 27. El tratamiento con selinexor aumentó la activación de γ H2AX en los fibroblastos HGPS.

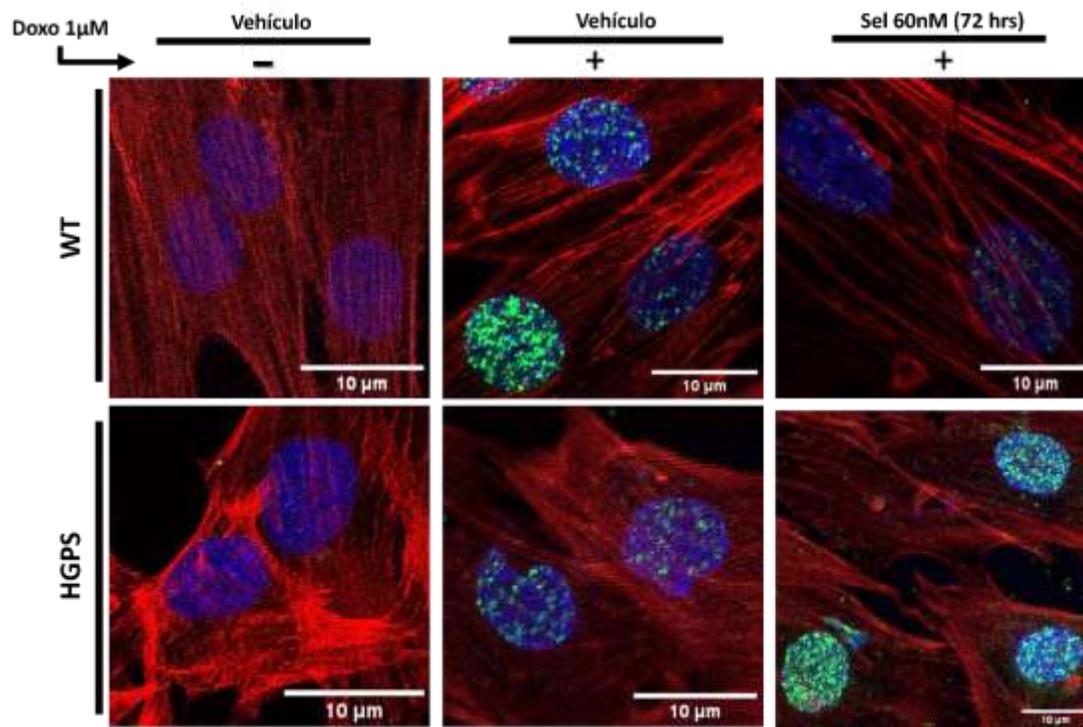


Figura 28. El selinexor tiene un efecto diferente sobre la activación de γ H2AX entre los cultivos WT y HGPS.

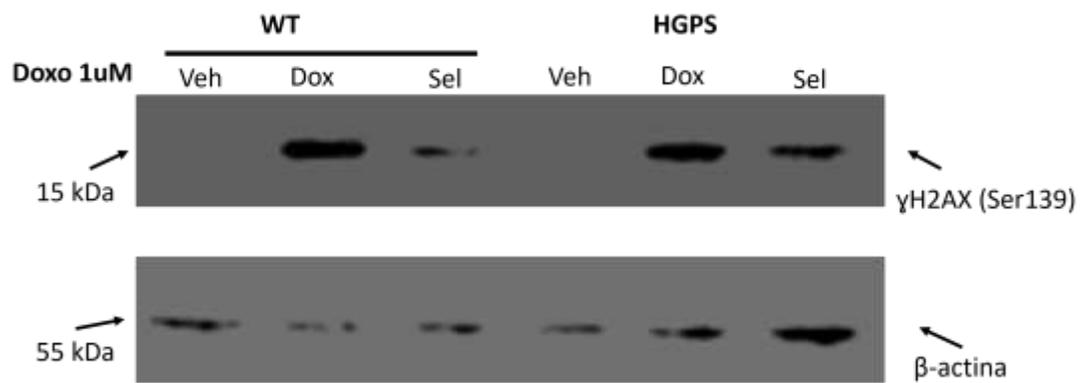


Figura 29. Evaluación del contenido de γ H2AX después del tratamiento con selinexor y la inducción de daño al ADN con Doxorubicina en los cultivos WT y HGPS.

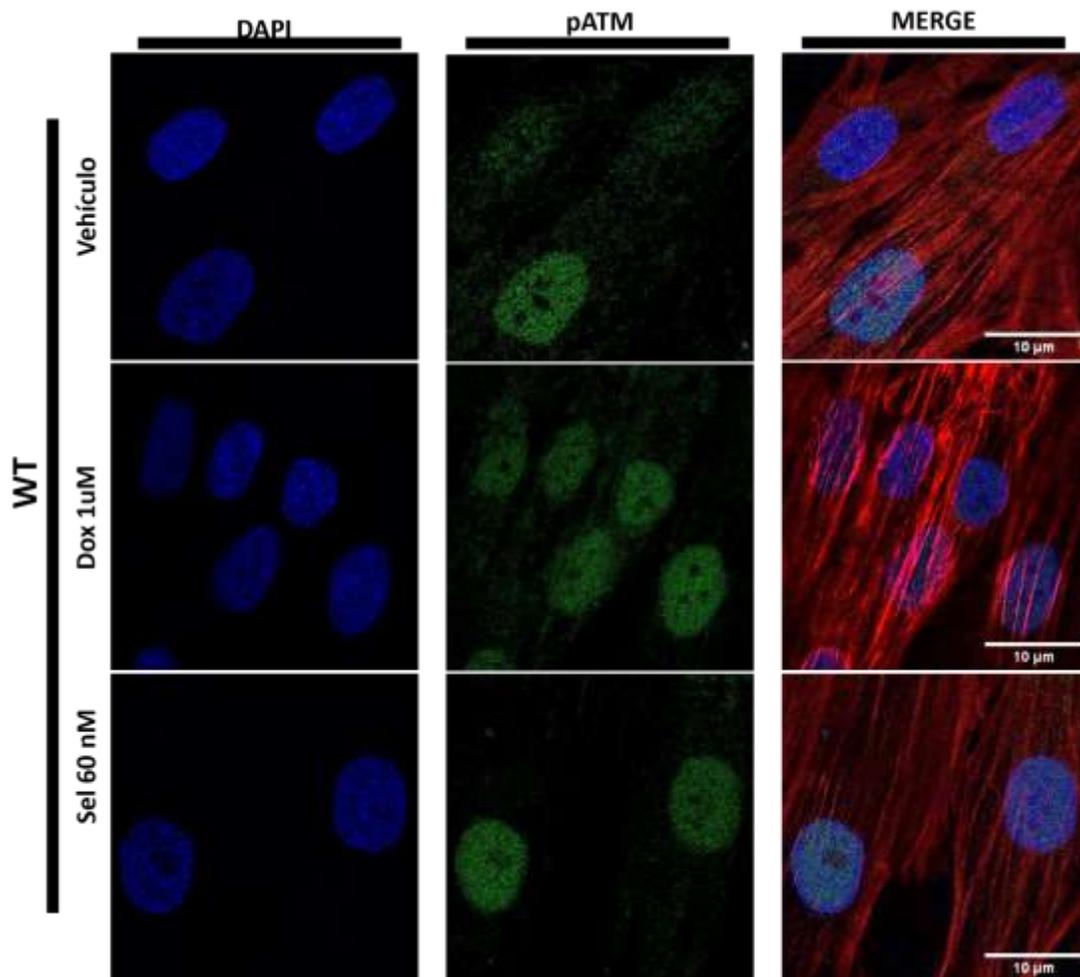


Figura 30. Localización subcelular de la cinasa ATM fosforilada (pATM) en los cultivos WT tratados con selinexor previamente a la inducción de daño al ADN con Doxorubicina.

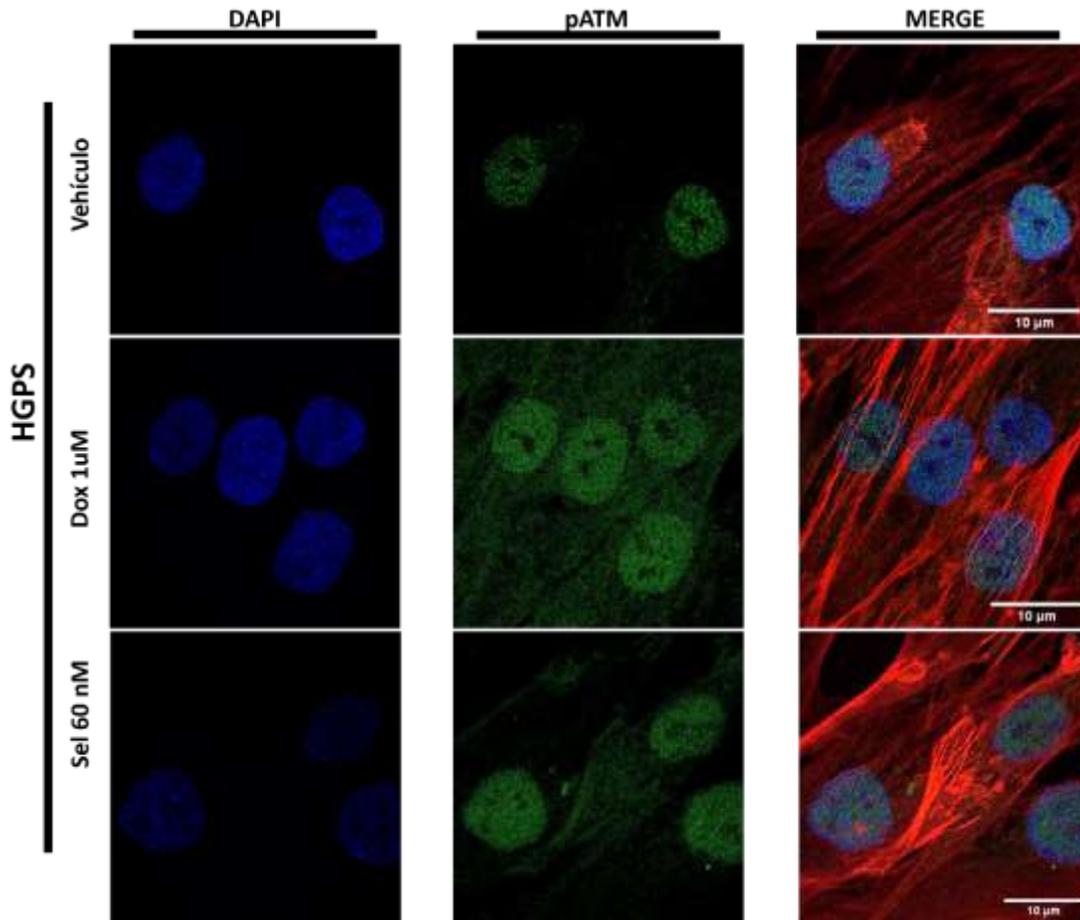


Figura 31. Localización subcelular de la cinasa ATM fosforilada (pATM) en los cultivos HGPS tratados con selinexor previamente a la inducción de daño al ADN con Doxorubicina.

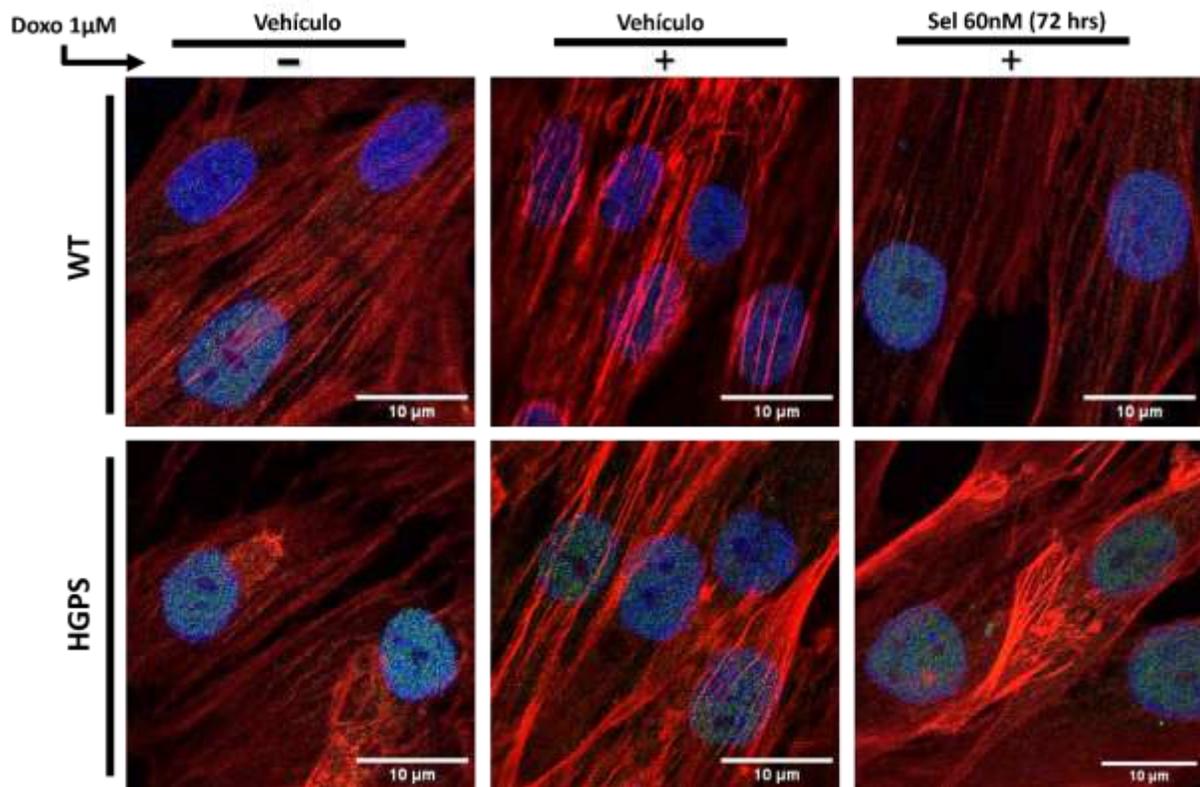


Figura 32. imagen comparativa de la localización subcelular de pATM en los cultivos WT y HGPS tratados con selinexor y Doxorubicina.

Discusión

Nuestro grupo de trabajo demostró previamente que el tratamiento de los fibroblastos HGPS con selinexor mitiga diferentes marcas de senescencia celular, incluyendo la morfología nuclear aberrante la expansión nucleolar, la pérdida de heterocromatina periférica y la disfunción mitocondrial. Con la finalidad de extender el análisis del efecto anti-senescente del selinexor en este estudio analizamos si este fármaco regula la respuesta de daño al ADN. Previamente se demostró que esta respuesta celular está comprometida en los fibroblastos HGPS¹⁸. Se sabe que el reclutamiento de 53BP1, Rad50 y Rad51 hacia los sitios de daño en el ADN sufre un retraso en los fibroblastos HGPS, acumulándose cortes en el ADN^{16,17}. Estos autores demostraron que el ensamblaje del aparato de respuesta al daño al ADN se altera en el HGPS debido al impacto negativo que causa la progerina sobre la heterocromatina. Además, Cobb AM y colaboradores³⁷ reportaron que la progerina ocasiona una pérdida de afinidad de 53BP1 por el complejo de reparación MRN; 53BP1 determina el tipo de reparación de daño al ADN que se va a ejecutar.

Para analizar la respuesta de daño al ADN utilizamos anticuerpos para detectar diferentes componentes de este sistema, incluyendo la cinasa ATM y la histona H2AX fosforiladas. Mientras que para inducir la respuesta de daño al ADN utilizamos el mutágeno Doxorubicina. Observamos que se activa γ H2AX como respuesta al tratamiento con Doxorubicina en ambos cultivos (WT y HGPS). No obstante, la respuesta de los fibroblastos HGPS fue más débil, como lo demuestra el número menor de focos de γ H2AX y la reducción de su contenido, en comparación con los fibroblastos WT. Así mismo, ATM se activa como respuesta a Doxorubicina y se acumula en el núcleo. De manera interesante, el tratamiento con selinexor previo a la inducción de daño al ADN con Doxorubicina modificó la activación de γ H2AX. El número de focos y

contenido de γ H2AX fueron menores en los fibroblastos WT tratados con selinexor, en comparación con el cultivo no tratado. Por otra parte, los fibroblastos HGPS tratados con este fármaco mostraron un incremento tanto de los focos como de los niveles de γ H2AX, en comparación con el cultivo HGPS no tratado. Postulamos que en las células WT la incubación con selinexor ayudó a que la respuesta de daño al ADN se resolviera más rápido que en el cultivo WT no tratado. Por lo que respecta a los fibroblastos HGPS, se sabe que el selinexor recupera la marca de heterocromatina H3K9me3, marca esencial para una activación óptima de ATM³⁴; por lo que la respuesta de daño al ADN de los fibroblastos HGPS pudo ser más robusta en presencia del fármaco. En el mismo sentido, Chojnowski A y colaboradores³⁸ reportaron que la ganancia de heterocromatina está asociada indirectamente con una respuesta más efectiva de daño al ADN. Así mismo el selinexor reduce las especies reactivas de oxígeno presentes en los fibroblastos HGPS (datos no publicados), por lo que se espera que haya menos daño oxidativo sobre el ADN en los cultivos tratados. Finalmente, es importante resaltar que el selinexor induce una caída en el nivel de la progerina por un mecanismo no conocido aun, por lo que este hecho por sí solo debe reflejarse en un alivio del estrés celular y una mejoría general de la fisiología de los fibroblastos HGPS, incluyendo una mitigación de la inestabilidad genómica.

Es necesario profundizar nuestros estudios analizando otros componentes del aparato de reparación de daño al ADN como 53BP1, ya que este sirve como andamio para el anclaje de otras proteínas involucradas en la reparación del daño al ADN, así como analizar la estabilidad de los telómeros en presencia del selinexor. Ya que el incremento de la fosforilación de la histona H2AX no indica directamente que exista una disminución en el daño al ADN, se debe evaluar la integridad del ADN genómico por medio de un ensayo cometa en las diferentes condiciones experimentales.

Conclusiones

- La administración de Selinexor sobre los cultivos HGPS mejoró la respuesta de daño al ADN, de acuerdo con la eficiente fosforilación de la histona H2AX (γ H2AX).
- La acumulación nuclear de ATM mediada por selinexor en células HGPS, implica una respuesta óptima al daño al ADN.

Referencias

1. Chalise, H. N. (2019). Aging: Basic Concept. *American Journal of Biomedical Science & Research*, 1(1), 8–10. <https://doi.org/10.34297/ajbsr.2019.01.000503>.
2. Rodier F, Campisi J. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol*. 2011;192(4):547-56.
3. Toussaint O, Medrano EE, von Zglinicki T. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp. Gerontol*. 2000;35(8): 927-45.
4. Deursen I. The role of senescent cells in ageing. *Nature*. 2014;509(7501):439-446. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nature13193>.
5. Pollex RL, Hegele RA. Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Clin Genet*. 2004 Nov;66(5):375-81. doi: 10.1111/j.1399-0004.2004.00315.x
6. González Morán, M. G. (2014). Síndrome de Progeria de Hutchinson-Gilford. Causas, investigación y tratamientos farmacológicos. *Educación Química*, 25(4), 432–439. [https://doi.org/10.1016/s0187-893x\(14\)70063-1](https://doi.org/10.1016/s0187-893x(14)70063-1).
7. De Sandre-Giovannoli, A., Bernard, R., Cau, P., Navarro, C., Amiel, J., Boccaccio, I., Lyonnet, S., Stewart, C. L., Mun-nich, A., Le Merrer, M. y Lévy, N., Lamin A truncation in Hutchinson-Gilford progeria, *Science*, 300(5628), 2055, 2003.
8. Coutinho, H. D. M., Falcão-Silva, V. S., Gonçalves, G. F., & da Nóbrega, R. B. (2009). Molecular ageing in progeroid syndromes: Hutchinson-Gilford progeria syndrome as a model. *Immunity & Ageing*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/1742-4933-6-4>.
9. Eriksson, M., Brown, W. T., Gordon, L. B., Glynn, M. W., Singer, J., Scott, L., Erdos, M. R., Robbins, C. M., Moses, T. Y., Berglund, P., Dutra, A., Pak, E., Durkin, S., Csoka, A. B., Boehnke, M., Glover, T. W. y Collins, F. S., Recurrent de novo point

mutations in Lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome, *Nature*, 423(6937), 293-298, 2003.

10. Liu Y, Rusinol A, Sinensky M, Wang Y, Zou Y. DNA damage responses in progeroid syndromes arise from defective maturation of prelamin A. *J. Cell Sci.* 2006;119:4644–4649.
11. Phillip R. Musich, Yue Zou; DNA-damage accumulation and replicative arrest in Hutchinson–Gilford progeria syndrome. *Biochem Soc Trans* 1 December 2011; 39 (6): 1764–1769. doi: <https://doi.org/10.1042/BST20110687>.
12. Vardanyan, R., & Hruby, V. J. (2006). Antineoplastics. In Elsevier eBooks (pp. 389–418). <https://doi.org/10.1016/b978-044452166-8/50030-3>
13. Rivera-Torres J, Acín-Perez R, Cabezas-Sánchez P, Osorio FG, Gonzalez-Gómez C, Megias D, Cámara C, López-Otín C, Enríquez JA, Luque-García JL, Andrés V. Identification of mitochondrial dysfunction in Hutchinson-Gilford progeria syndrome through use of stable isotope labeling with amino acids in cell culture. *J Proteomics.* 2013 Oct 8;91:466-77. doi: 10.1016/j.jprot.2013.08.008. Epub 2013 Aug 20. PMID: 23969228.
14. Gonzalo S. (2014). DNA damage and lamins. *Advances in experimental medicine and biology*, 773, 377–399. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-8032-8_17.
15. Salguero, I., Belotserkovskaya, R., Coates, J. et al. MDC1 PST-repeat region promotes histone H2AX-independent chromatin association and DNA damage tolerance. *Nat Commun* 10, 5191 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12929-5>.
16. Ashapkin, V. V., Kutueva, L. I., Kurchashova, S. Y., & Kireev, I. I. (2019). Are There Common Mechanisms Between the Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome and Natural Aging?. *Frontiers in genetics*, 10, 455. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00455>.
17. Gonzalo S, Kreienkamp R. DNA repair defects and genome instability in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *Curr Opin Cell Biol.* 2015 Jun;34:75-83. doi: 10.1016/j.ceb.2015.05.007. Epub 2015 Jun 12. PMID: 26079711; PMCID: PMC4522337.
18. Liu, B., Wang, J., Chan, K. et al. Genomic instability in laminopathy-based premature aging. *Nat Med* 11, 780–785 (2005). <https://doi.org/10.1038/nm1266>.
19. Gonzalo S, Kreienkamp R, Askjaer P. Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome: A premature aging disease caused by LMNA gene mutations. *Ageing Res Rev.* 2017

- Jan;33:18-29. doi: 10.1016/j.arr.2016.06.007. Epub 2016 Jun 29. PMID: 27374873; PMCID: PMC5195863.
20. Beyret, E., Liao, H. K., Yamamoto, M., Hernandez-Benitez, R., Fu, Y., Erikson, G., Reddy, P., & Izpisua Belmonte, J. C. (2019). Single-dose CRISPR–Cas9 therapy extends lifespan of mice with Hutchinson–Gilford progeria syndrome. *Nature Medicine*, 25(3), 419–422. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0343-4>.
 21. Osorio, F. G., Navarro, C. L., Cadinanos, J., Lopez-Mejia, I. C., Quiros, P. M., Bartoli, C., Rivera, J., Tazi, J., Guzman, G., Varela, I., Depetris, D., de Carlos, F., Cobo, J., Andres, V., de Sandre-Giovannoli, A., Freije, J. M. P., Levy, N., & Lopez-Otin, C. (2011). Splicing-Directed Therapy in a New Mouse Model of Human Accelerated Aging. *Science Translational Medicine*, 3(106), 106ra107. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002847>.
 22. Davies, B. S., Barnes, R. H. 2nd, Tu, Y., Ren, S., Andres, D. A., Spielmann, H. P., ... Fong, L. G. (2010). An accumulation of non-farnesylated prelamin A causes cardiomyopathy but not progeria. *Human Molecular Genetics*, 19(13), 2682–2694. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq158>.
 23. García-Aguirre, I., Alamillo-Iniesta, A., Rodríguez-Pérez, R., Vélez-Aguilera, G., Amaro-Encarnación, E., Jiménez-Gutiérrez, E., Vásquez-Limeta, A., Samuel Laredo-Cisneros, M., Morales-Lázaro, S. L., Tiburcio-Félix, R., Ortega, A., Magaña, J. J., Winder, S. J., & Cisneros, B. (2019). Enhanced nuclear protein export in premature aging and rescue of the progeria phenotype by modulation of CRM1 activity. *Aging Cell*, 18(5). <https://doi.org/10.1111/ace1.13002>.
 24. Datta S, Snow CJ, Paschal BM. (2014) A pathway linking oxidative stress and the Ran GTPase system in progeria. *Molecular Biology of the Cell in Press*. Jan, 2014. Vol 25: 1202-1215.
 25. Cisneros B, García-Aguirre I. Nuclear protein export pathway in aging therapeutics. *Aging (Albany NY)*. 2020 Mar 19;12(6):4682-4684. doi: 10.18632/aging.102948. Epub 2020 Mar 19. PMID: 32200356; PMCID: PMC7138584.
 26. FDA Oncologic Drugs Advisory Committee Meeting (2019) Selinexor, Applicant: Karyopharm Therapeutics, Inc. NDA 212306.
 27. Adamowicz M. (2018). Breaking up with ATM. *Journal of immunological sciences*, 2(1), 26–31.
 28. Davis, A., & Chen, D. (2013). DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Translational Cancer Research*, 2(3), 130-143. doi:10.21037/1142.

29. Burla, R., La Torre, M., Merigliano, C., Verni, F., & Saggio, I. (2018). Genomic instability and DNA replication defects in progeroid syndromes. *Nucleus*, 9(1), 368–379. <https://doi.org/10.1080/19491034.2018.1476793>
30. Robison JG, Lu L, Dixon K, Bissler JJ. DNA lesion-specific co-localization of the Mre11/Rad50/Nbs1 (MRN) complex and replication protein A (RPA) to repair foci. *J Biol Chem*. 2005 Apr 1;280(13):12927-34. doi: 10.1074/jbc.M414391200. Epub 2005 Jan 14. PMID: 15653682.
31. Kumar, R., & Cheok, C. F. (2014). RIF1: A novel regulatory factor for DNA replication and DNA damage response signaling. *DNA Repair*, 15, 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.12.004>
32. Frit, P., Barboule, N., Yuan, Y., Gomez, D., & Calsou, P. (2014). Alternative end-joining pathway(s): Bricolage at DNA breaks. *DNA Repair*, 17, 81–97. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.02.007>
33. Stinson, B. M., & Loparo, J. J. (2021). Repair of DNA Double-Strand Breaks by the Nonhomologous End Joining Pathway. *Annual Review of Biochemistry*, 90(1), 137–164. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-080320-110356>
34. 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167454>
35. Sishc, B., & Davis, A. (2017). The Role of the Core Non-Homologous End Joining Factors in Carcinogenesis and Cancer. *Cancers*, 9(7), 81. <https://doi.org/10.3390/cancers9070081>
36. Carvalho C, Santos RX, Cardoso S, Correia S, Oliveira PJ, Santos MS, Moreira PI. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Curr Med Chem*. 2009;16(25):3267-85. doi: 10.2174/092986709788803312. Epub 2009 Sep 1. PMID: 19548866.
37. Cobb AM, Larrieu D, Warren DT, Liu Y, Srivastava S, Smith AJO, Bowater RP, Jackson SP, Shanahan CM. Prelamin A impairs 53BP1 nuclear entry by mislocalizing NUP153 and disrupting the Ran gradient. *Aging Cell*. 2016 Dec;15(6):1039-1050. doi: 10.1111/accel.12506. Epub 2016 Jul 27. PMID: 27464478; PMCID: PMC5114580.
38. Chojnowski A, Ong PF, Foo MXR, et al. Heterochromatin loss as a determinant of progerin-induced DNA damage in Hutchinson–Gilford Progeria. *Aging Cell*. 2020; 19:e13108. <https://doi.org/10.1111/accel.13108>