



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**Efecto de la inhibición farmacológica de CRM1 sobre el
daño cardiaco del ratón modelo de progeria**

T E S I S

Que presenta

Angelica Soberano Nieto

**Para obtener el grado de:
MAESTRA EN CIENCIAS
EN LA ESPECIALIDAD DE
GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

Directores de tesis:

Dr. Bulmaro Cisneros Vega

Dr. Marlon De Ita Ley

Este trabajo se realizó en el laboratorio de genética humana del departamento de Genética y Biología Molecular perteneciente al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav) unidad Zacatenco bajo la asesoría del Dr. Bulmaro Cisneros Vega.

Durante la realización del trabajo se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) bajo el programa de Becas Nacionales Para Estudios De Posgrado 2022, CVU: 1227518.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres: Aníbal y Angélica, mis mayores ejemplos a seguir y los héroes de mi vida. Los amo con el alma y no me daría la vida para agradecerles todo lo que han hecho por sus hijos.

A mis hermanos: Zizinette, Maripily y Aníbal, por ser los seres que más me han acompañado con su ternura y amor. Sus concejos, sus risas y su apoyo han sido los mayores cimientos en mi vida.

A mis abuelos: Aníbal, Maripily y Dorita. Por el gran amor que me han tenido, por sus concejos y por nunca dejarme sola.

A mis tíos: Gina, Ceci, Quique, Pablo por el gran apoyo y amor que siempre han mantenido hacia mí, por quererme como una hija y protegerme como tal, gracias porque en ustedes encuentro un cobijo de amor inigualable.

A mi prima Paola, por ser como mi hermana y hacer muy alegre mi vida.

A mis amigos de generación de maestría, por encontrar en ellos los mejores colegas y amigos.

A mis mejores amigos de la vida, Priscila, Rameses, Joel, Guillermo, Claudia, Tania, Athziri, Abisaí, Sharon, Ere y Gonzalo, por estar para mí incondicionalmente por casi una década. En ustedes encuentro el cobijo de una familia.

A Emilio, por enseñarme a que podía hacer las cosas por mi cuenta, a impulsarme a crecer profesionalmente y enseñarme a enfocarme en mí. Por ser parte importante en mi vida y en la decisión de hacer la maestría.

Al Dr. Bulmaro Cisneros Vega, por darme la oportunidad de estar en su laboratorio y por todas las enseñanzas que trajo a mi formación profesional.

Al Dr. Marlon de Ita Ley, que no habría palabras para agradecerle todo el apoyo, comprensión, enseñanza y aprendizajes que me brindó en todo el proceso de mi tesis. Gracias por creer en mí, por darme las herramientas necesarias para crecer en mi formación profesional, por ser un ejemplo a seguir en mi vida y por encontrar en ti un amigo.

A Pablo y Vero, Auxiliar y Técnico de laboratorio, por todo el apoyo y la amistad que me brindaron durante la elaboración de mi tesis.

A todo el laboratorio 12, por convertirse en una familia para mí, por el mejor ambiente de trabajo, por las risas y los buenos momentos. Por sus concejos y el apoyo diario entre todos. Son una curita en mi vida y tendrán un lugar por siempre en mi corazón.

A Tania, Juan, Mariel e Imanol, por el gran cariño que han mostrado en mí, por acompañarme en los momentos más difíciles, por sus concejos y el apoyo incondicional que encuentro en ustedes. Gracias por convertirse aquí en CDMX en el cobijo que más necesitaba en mi vida. Gracias por su amistad.

RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares representan la principal causa de mortalidad en el adulto mayor, y el estudio de estas afecciones requiere del empleo de modelos de envejecimiento prematuro, como el síndrome de progeria de Hutchinson Gilford (HGPS). El HGPS es una enfermedad rara causada por la expresión de progerina, variante mutante de la lámina A. La progerina altera la envoltura nuclear afectando en consecuencia múltiples procesos celulares, lo que en última instancia genera senescencia celular. Nuestro laboratorio describió recientemente que la progerina provoca la sobreexpresión de CRM1, exportina que regula el tráfico de proteínas del núcleo hacia el citoplasma, alterando la proteostasis celular. Interesantemente, la inhibición farmacológica de CRM1 utilizando selinexor (inhibidor selectivo de CRM1), mitigó la senescencia celular en cultivos de fibroblastos provenientes de pacientes con HGPS, mediante el restablecimiento del balance núcleo-citoplásmico de proteínas y la inducción de la degradación de progerina mediante autofagia.

Considerando esto antecedentes, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto geroprotector del selinexor in vivo, empleando el ratón modelo del HGPS ($Lmna^{G609G/G609G}$). Específicamente, nuestro estudio se enfocó sobre las alteraciones cardiacas del ratón progeroide y el efecto potencial del selinexor sobre la histopatología cardiaca. Para abordar nuestro objetivo, se trataron los ratones silvestres (WT) y $Lmna^{G609G/G609G}$ con selinexor (2.5mg/kg) o el vehículo solamente durante ocho semanas, y posteriormente se disecaron los corazones para su análisis morfológico, histopatológico y bioquímico. Resultados: El corazón del ratón $Lmna^{G609G/G609G}$ mostró un tamaño y peso menor, y la presencia de progerina en la envoltura nuclear de los miocardiocitos; consecuentemente, estos miocardiocitos tienen una morfología nuclear aberrante y un área longitudinal menor, en comparación con los miocardiocitos del ratón silvestre. Además, los miocardiocitos del ratón progeroide sobreexpresaron BNP, lo que sugiere daño cardíaco, y una baja expresión de los factores de transcripción cardiacos Mef2d y Mef2a. Debido a que estos factores regulan la hipertrofia cardiaca, su baja expresión en los miocardiocitos podría estar relacionada con la atrofia cardiaca que exhibe el ratón progeroide. Relevantemente, el tratamiento con selinexor aumento el tamaño del corazón, disminuyó el número de miocardiocitos positivos para progerina y redujo significativamente el número de núcleos aberrantes. Así mismo, el

tratamiento con selinexor aumento el área longitudinal pero no transversal de los miocardiocitos, disminuyó la cantidad de BNP, aumentó la cantidad de troponina C, y restableció la expresión de Mef2d y Mef2a, en comparación con el ratón *Lmna*^{G609G/G609G} tratado con el vehículo solamente. Conclusiones. En su conjunto nuestros resultados indican que el tratamiento con selinexor mejoró la histopatología del corazón, reduciendo la atrofia cardíaca, y atenuó el daño cardíaco.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases represent the leading cause of mortality in the elderly. To study these conditions, it is necessary to use models of premature aging, such as Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS). Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS) is a rare disease caused by the expression of progerin, a mutant variant of lamin A. Progerin disrupts the nuclear envelope, thereby affecting multiple cellular processes and ultimately leading to cellular senescence. Recently, our laboratory described how progerin causes overexpression of CRM1, an exportin that regulates protein trafficking from the nucleus to the cytoplasm, thereby altering cellular proteostasis. Noteworthy, pharmacological inhibition of CRM1 using selinexor (a selective inhibitor of CRM1) mitigates the senescence of HGPS patient-derived fibroblasts. This effect is attributed to the restoration of nucleus-cytoplasmic partition of proteins and the induction of progerin degradation by autophagy.

In light of the aforementioned background, the objective of the present study was to assess the geroprotective impact of selinexor *in vivo* using the mouse model of HGPS (Lmna^{G609G/G609G}). This study specifically focused on the cardiac alterations of the progeroid mouse model and the potential effect of selinexor on cardiac histopathology. To approach this objective, wild-type (WT) and Lmna^{G609G/G609G} mice were treated with selinexor (2.5 mg/kg) or vehicle alone for eight weeks, after which the hearts were dissected for morphological, histopathological, and biochemical analyses. The Lmna^{G609G/G609G} mouse heart exhibited reduced size and weight, accompanied by the presence of progerin in the nuclear envelope of cardiomyocytes. Consequently, these cardiomyocytes displayed aberrant nuclear morphology and a smaller longitudinal area compared to wild-type mouse cardiomyocytes. Furthermore, cardiomyocytes from the progeroid mouse exhibited overexpression of BNP, indicative of cardiac damage, and low expression of the cardiac transcription factors Mef2d and Mef2a. As these factors regulate cardiac hypertrophy, their low expression in the myocardiocytes may be related to the cardiac atrophy exhibited by the progeroid mouse. Noteworthy, selinexor treatment resulted in an increase in heart size, a reduction in the number of progerin-positive myocardiocytes, and a significant decrease in the number of aberrant nuclei. Similarly, treatment with selinexor resulted in an increase in

the longitudinal but not the cross-sectional area of cardiomyocytes, a reduction in the amount of BNP, an increase in the amount of troponin C, and a restoration of the expression of Mef2d and Mef2a in the *Lmna*^{G609G/G609G} mouse, compared with the vehicle-treated control. In conclusion, the results of this study indicate that selinexor treatment has a beneficial effect on cardiac histopathology, reducing cardiac atrophy and attenuating cardiac damage.

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
Envejecimiento	1
Mecanismos celulares asociados al envejecimiento	1
Síndrome de progeria Hutchinson Gilford.....	2
MARCO TEORICO	4
Alteraciones cardiovasculares en el HGPS.....	4
Modelo murino <i>Lmna</i> p.G609G.....	4
Alteraciones celulares asociadas con la presencia de progerina	6
Alteraciones del transporte núcleo citoplásmico en HGPS	7
Alteraciones cardiacas en el modelo murino <i>Lmna</i> p.G609G	7
Regulación molecular de la hipertrofia de los miocardiocitos.....	8
Inhibición de CRM1: Selinexor	10
Selinexor como tratamiento para modulación cardiovascular en HGPS	10
JUSTIFICACIÓN.....	12
HIPOTESIS	12
OBJETIVO GENERAL	12
OBJETIVOS ESPECIFICOS	12
MATERIALES Y METODOS.....	13
Animales	13
Tratamiento farmacológico.....	13
Histología.....	13
Inmunofluorescencia de cortes de tejido cardiaco	14
Inmunohistoquímica de tejido cardiaco	14
Aglutinado germinal de trigo (WGA).....	15
Western Blot	15
RESULTADOS	17
Análisis histopatológico del corazón de los ratones silvestres y <i>Lmna</i> ^{G609G/G609G}	17
El tratamiento con selinexor aumentó el peso del corazón de los ratones <i>Lmna</i> ^{G609G/G609G}	18
El tratamiento con selinexor disminuyó el número de núcleos aberrantes de los miocardiocitos del ratón <i>Lmna</i> ^{G609G/G609G}	19

El tratamiento con selinexor disminuyó el número de núcleos positivos a progerina en los miocardiocitos del ratón Lmna ^{G609G/G609G}	20
El tratamiento con selinexor disminuyó el área transversal de los miocardiocitos del ratón Lmna ^{G609G/G609G}	21
El tratamiento con selinexor recuperó el área longitudinal de los miocardiocitos del ratón Lmna ^{G609G/G609G}	22
BNP esta sobreexpresado en los miocardiocitos del ratón Lmna ^{G609G/G609G} pero disminuye después del tratamiento con selinexor.....	24
Los factores Mef2d y Mef2a se encuentran disminuidos en el miocardio del ratón Lmna ^{G609G/G609G} pero se recuperan después del tratamiento con selinexor	25
La exportina CRM1 se localiza mayoritariamente en el núcleo de los miocardiocitos del ratón Lmna ^{G609G/G609G}	26
DISCUSIÓN.....	28
CONCLUSIÓN	32
BIBLIOGRAFÍA.....	33

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Procesamiento anormal de la lámina A en el HGPS.	3
Figura 2. Estructura química de Selinexor.....	10
Figura 3. Análisis histopatológico del tejido cardíaco de los ratones WT y Lmna G609G/G609G	18
Figura 4. Análisis de la morfología y peso de os corazones de los ratones WT y Lmna ^{G609G/G609G} tratados con selinexor o el vehículo.....	19
Figura 5. Disminución de núcleos aberrantes en los miocardiocitos del ratón Lmna ^{G609G/G609G} tratado con selinexor.	20
Figura 6. Los núcleos positivos para progerina disminuyeron como respuesta al tratamiento con selinexor.....	21
Figura 7. Análisis del área transversal de los miocardiocitos de los ratones silvestre (WT) y Lmna ^{G609G/G609G} tratados con selinexor o con el vehículo solamente.....	22
Figura 8. Aumentó del área longitudinal de los miocardiocitos del ratón Lmna ^{G609G/G609G} como respuesta al selinexor	23
Figura 9. BNP se encuentra sobreexpresado en los ratones Lmna ^{G609G/G609G} y disminuye tras el tratamiento con selinexor.....	24
Figura 10. Análisis de los factores Mef2d y Mef2a en el corazón de los ratones silvestres y Lmna ^{G609G/G609G} tratados con selinexor o con el vehículo solamente.	26
Figura 11. Localización y expresión de CRM1 en los miocardiocitos de los ratones progeroides. a	27
Figura 12. Efecto del tratamiento con selinexor sobre los miocardiocitos del ratón Lmna G609G/G609G	32

INTRODUCCIÓN

Envejecimiento

El envejecimiento es un proceso gradual asociado a la edad cronológica que se presenta en prácticamente todos los seres vivos, incluyendo los humanos. En los seres humanos, el envejecimiento es la etapa de vida que inicia a partir de la edad adulta media, cuando las funciones físicas y cognitivas empiezan a presentar un declive gradual (1). En esta etapa la aparición y prevalencia de enfermedades crónico-degenerativas son en parte, consecuencias del daño y degeneración tisular asociado al envejecimiento.

Este proceso es el resultado de la acumulación progresiva de daño celular y molecular, lo que resulta en una disminución de las capacidades físicas y mentales, y va acompañado de un aumento en la morbi-mortalidad. Dentro de las principales enfermedades que afectan a las personas envejecidas encontramos al Alzheimer, hipertensión, infarto, ictus, artrosis y artritis, osteoporosis, cataratas y Parkinson, así como las enfermedades cardiovasculares.

Mecanismos celulares asociados al envejecimiento

Las alteraciones subyacentes al envejecimiento incluyen defectos moleculares y celulares. Dentro de estas encontramos la acumulación de daño en el ADN, el acortamiento de los telómeros, la pérdida de proteostasis, las alteraciones epigenéticas, disfunción mitocondrial y proteostasis alterada. Estas anormalidades inducen la aparición de senescencia, inflamación crónica, comunicación intercelular desregulada, detección de nutrientes desregulada, agotamiento de células progenitoras, macroautofagia alterada, y disbiosis (1, 2).

Dado el impacto de diversos factores sobre el envejecimiento, incluyendo las afecciones genéticas, los factores ambientales e intrínsecos. Actualmente es complicado el estudio de este proceso (2). Considerando estas limitantes, se ha

propuesto el estudio de síndromes progeroides para comprender el mecanismo subyacente del envejecimiento y de las enfermedades asociadas a esta etapa de la vida.

Dentro de los síndromes progeroides encontramos el síndrome de progeria de Hutchinson Gilford (HGPS), un tipo de laminopatía ligada a una mutación en el gen que codifica para la lámina A (3). En este síndrome los sujetos afectados presentan una proporción importante de alteraciones que se manifiestan en el envejecimiento cronológico, incluyendo alteraciones músculo-esqueléticas y cardiovasculares(4).

Síndrome de progeria Hutchinson Gilford.

El HGPS es una enfermedad autosómica dominante provocada por una mutación puntual (c.1824C>T; pGly608Gly) en el exón 11 del gen *LMNA* (4). De forma general, los 12 exones del gen *LMNA* codifican para la lámina A, con una longitud de 664 aminoácidos, mientras que la lámina C comprende del exón 1 al exón 10, con una longitud de 572 aminoácidos (aa) (5).

La mutación asociada a este síndrome causa un splicing aberrante en los exones que son exclusivos de la lámina A. En condiciones normales esta proteína se traduce primero como pre-lámina A, la cual sufre una serie de modificaciones postraduccionales durante su maduración. La primera modificación es la farnesilación del residuo de cisteína (p.C661) en el motivo Caax del extremo C-terminal por FNTA and FNTB, lo que le permite su anclaje a la membrana nuclear. Posteriormente los residuos aaX son escindidos por las enzimas RCE1/FACE2 y/o ZMPSTE24. Posteriormente, ocurre un proceso de metilación de la farnesilcisteína a cargo de la enzima isoprenilcistein carboxil metiltransferasa (ICMT), este paso es necesario para su procesamiento final. Finalmente, para culminar el proceso de maduración se escinden los 15 aminoácidos finales de la región C-terminal farnesilada mediante la enzima ZMPSTE24 (5).

Al ocurrir la mutación puntual (c.1824C>T) en el exón 11 del gen *LMNA*, se genera un sitio de corte y empalme crítico. Este splicing anormal provoca la eliminación de 150 pb del mRNA que se traduce como la eliminación de 50 aa del C-terminal (606-656).

Como consecuencia final, se pierde la región de la proteína que es reconocida por la endoproteasa ZMPSTE24, impidiendo así que ocurra la maduración completa de la prelámina A. La proteína que surge de este splicing aberrante se denomina progerina, quien es la responsable del fenotipo de envejecimiento prematuro en el HGPS. (Figura 1) (6).

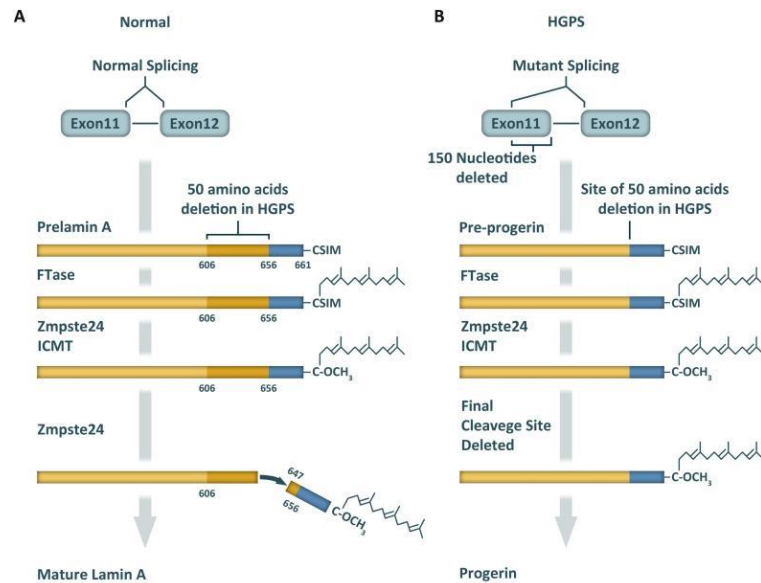


Figura 1. Procesamiento anormal de la lámina A en el HGPS. Imagen tomada de Gonzalo. *et al* (2017) (7)

El HGPS está caracterizado por un envejecimiento prematuro y acelerado. Presenta una incidencia de 1 de 20 millones de personas y se estima que existen de 300 a 350 niños viviendo con HGPS alrededor el mundo (6). La presencia de progerina es deletérea para los pacientes. Los pacientes con el diagnóstico de HGPS comienzan a presentar los síntomas a partir del primero o segundo año de vida. Dentro de las características clínicas comunes se encuentran retraso grave del crecimiento, alopecia, aterosclerosis con deterioro cardiovascular, osteoporosis, pigmentación anormal de la piel, lipodistrofia y contracturas articulares. Los pacientes presentan un promedio de vida alrededor de los 14 años, teniendo como principal causa de muerte las alteraciones cardiovasculares (8)(16).

MARCO TEORICO

Alteraciones cardiovasculares en el HGPS

A partir de los 6 a los 8 años de vida los pacientes con HGPS empiezan a presentar problemas en el sistema cardiovascular. El fenotipo vascular de HGPS se compone por aterosclerosis generalizada, calcificación y fibrosis arterial, pérdida preponderante de células de músculo liso y rigidez vascular (19, 20). Por otra parte, se presentan anomalías en la repolarización cardíaca, disfunción diastólica del ventrículo izquierdo, enfermedad valvular, defectos electrocardiográficos resultantes de anomalías en la repolarización cardíaca (17). En HGPS la disfunción diastólica del ventrículo izquierdo está asociada con defectos electrocardiográficos, consecuencia de la fibrosis intersticial miocárdica, entre otros factores.

Además, los pacientes con HGPS presentan hipertrofia en el ventrículo izquierdo, así como estenosis aortica severa, alteraciones detectadas utilizando ecocardiografía tridimensional (17). Estas alteraciones contribuyen a la muerte de los pacientes con HGPS por infarto de miocardio, accidente cerebrovascular e insuficiencia cardíaca (17, 18). Por lo tanto, el tratamiento de pacientes con HGPS se enfoca mayoritariamente en la mitigación de estas alteraciones.

Modelo murino *Lmna* p.G609G

Debido a las limitantes intrínsecas de la baja prevalencia del HGPS, se han desarrollado diversos modelos murinos que asemejan la fisiopatología de HGPS con el objetivo de estudiar la enfermedad y desarrollar posibles tratamientos. En 2011, Osorio y colaboradores desarrollaron el primer modelo murino que expresa progerina debido a una mutación en el sitio 1827C>T (p.G609G) del gen *Lmna*, el cual recrea el HGPS del humano (9).

En los tejidos del animal *Lmna* p.G609G se observó que los ratones heterocigotos presentan cantidades similares de lámina A, lámina C y progerina, mientras que los ratones homocigotos presentan altos niveles de lámina C y progerina y muy poca cantidad de lámina A (9). Independientemente del genotipo, los ratones mutantes exhiben núcleos deformes debido a la acumulación de progerina en la membrana nuclear interna (9).

Con respecto a las características fisiológicas, los ratones heterocigotos comienzan a envejecer a las 8 semanas y fallecen alrededor de los 242 días. Por otra parte, ratones homocigotos presentan una esperanza de vida reducida, con una vida media de 105 días, y desarrollan alteraciones cardiovasculares, retraso en el desarrollo, defectos óseos, y pérdida de depósitos de grasa (9).

Con respecto al fenotipo cardiovascular del ratón *Lmna* p.G609G, se ha estudiado de forma extensiva el daño que causa la progerina a nivel de los vasos sanguíneos, pero existen pocos estudios de lo que ocurre a nivel del miocardio. Se ha observado pérdida de células del músculo liso vasculares (VSMC) en la media de la aorta y en otras arterias de calibre pequeño del ratón progeroide. Los defectos de mecanotransducción que genera la progerina en el músculo liso de los vasos sanguíneos genera la muerte de estas células, así como estrés del retículo endoplásmico (RE), daño en el DNA y alteraciones en la conexión nucleocitoplasmática (9, 10), al igual que un engrosamiento de la adventicia acompañada de secreción de fibras de colágena. En el arco de la aorta se presentaban estas mismas alteraciones vasculares al igual que una acumulación de proteoglicano. Las fibras de elastina presentan pérdida de ondulaciones y hay un aumento en la rigidez de los vasos sanguíneos, ocasionando fibrosis que alcanza las arterias coronarias. (9, 10).

A nivel del corazón, se ha descrito hipertrofia del ventrículo izquierdo asociada a su despolarización tanto en los pacientes como en el ratón progeroide (9, 10). La remodelación cardiaca puede ser mediada por fallas en el miocardio o ser una respuesta a la sobrecarga crónica secundaria de la remodelación anormal de la aorta. Independientemente de la causa, se desencadena una respuesta en los miocardiocitos que se refleja como crecimiento hipertrófico en las cámaras del corazón (11). Este

proceso anormal puede producir daño irreversible en los miocardiocitos, ocasionando su muerte y reemplazo por fibras de colágena que producen los fibroblastos cardiacos, llevando finalmente a una insuficiencia cardiaca en estos pacientes (11). Considerando este escenario, es necesario desarrollar estrategias farmacológicas que alivien la hipertrofia cardiovascular del ratón *Lmna* p.G609G.

Alteraciones celulares asociadas con la presencia de progerina

Las alteraciones del gen *LMNA*, aparte del HGPS, están asociadas con diversos trastornos, incluidas las enfermedades cardiovasculares. Por ejemplo, las laminopatías puede manifestarse como miocardiopatía dilatada, insuficiencia cardíaca, y arritmias cardíacas, entre otras (3). Si bien estas alteraciones de las láminas se han descrito mayormente debidas a deleciones o mutaciones que afectan la longitud de la lámina A, hace falta información sobre el impacto que causa la lámina A mutante, progerina, a nivel celular y sobre todo a nivel cardiovascular.

De forma general se sabe que las láminas nucleares tienen como función principal conferirle estructura y rigidez al núcleo y participar en varios procesos celulares, como, migración celular, organización de la cromatina, regulación epigenética, replicación y reparación del ADN (5, 12); por lo tanto, alteraciones de la lámina A/C pueden interferir con estos procesos.

A nivel cardiovascular existen varios modelos que describen el papel que tiene progerina en la patología molecular del HGPS. Existen modelos de células de músculo liso, endotelio vascular y de fibroblastos, donde se ha encontrado que la presencia de progerina afecta de forma general las funciones nucleares, y conduce a múltiples anomalías a nivel celular y funcional. En los fibroblastos de pacientes con HGPS se ha documentado que la progerina provoca senescencia celular, anormalidades de la morfología nuclear, pérdida de heterocromatina, expansión nucleolar, anormalidades en la envoltura nuclear, alteraciones en la respuesta de daño al ADN, disfunción mitocondrial y recientemente, desequilibrio en la transportación de proteínas núcleo-

citoplásmica. (13). Estas alteraciones de la función celular son posibles blancos terapéuticos para el tratamiento de los pacientes con HGPS.

Alteraciones del transporte núcleo citoplásmico en HGPS

CRM1 es la principal exportina encargada del transporte de proteínas entre el núcleo y el citoplasma. Esta proteína se encarga de trasladar moléculas a través del complejo del poro nuclear (NPC) por medio del reconocimiento de la región de exportación nuclear (NES) ricas en aminoácidos hidrófobos (14), empleando Ran-GTP. En el citoplasma, Ran-GTP es hidrolizado a GDP, permitiendo así que las moléculas cargo se liberen de CRM1 y quede libre de nuevo la exportina para continuar su labor. Considerando esto, el cambio de su expresión puede llevar a un desequilibrio en la distribución de proteínas entre el núcleo y el citoplasma; entre las moléculas deslocalizadas se podrían encontrar proteínas críticas como factores de transcripción, enzimas y proteínas estructurales (15).

Una de las características del envejecimiento es la pérdida de proteostasis, que es mediada por CRM1. En los fibroblastos de pacientes con HGPS y de personas sanas con envejecimiento cronológico se ha observado un incremento en el nivel de CRM1, lo que ocasiona la deslocalización de proteínas con NES del núcleo hacia el citoplasma (14).

Esta sobreexpresión es central dentro de la patogénesis de HGPS. Ya que al utilizar Leptomicina B, un inhibidor específico de CRM1, se observó que se mejoraba el fenotipo celular de los fibroblastos HGPS. El tratamiento mitigó las marcas de envejecimiento que incluyen, la morfología nuclear aberrante, la expansión nucleolar, la senescencia celular y la pérdida de heterocromatina periférica (14, 16) Considerando estos antecedentes, la sobreexpresión de CRM1 es un mecanismo común tanto en el envejecimiento patológico como normal (14, 16) y puede ser un determinante de la patología cardiovascular.

Alteraciones cardiacas en el modelo murino *Lmna p.G609G*

Recientemente se ha empezado a caracterizar las afecciones presentes en el corazón de los ratones Lmna p.G609G. se reportó la presencia de anomalías ecocardiográficas, al haber una reducción en el volumen sistólico, en el gasto cardiaco y la función diastólica del ventrículo izquierdo, así como una función sistólica reducida. A nivel histológico se reportó la presencia de núcleos aberrantes en los miocardiocitos de ratones Lmna p.G609G (21).

Yu chen y colaboradores reportaron presencia de atrofia cardiaca en el ratón Lmna p.G609G así como la presencia de inestabilidad genómica, evidenciada por una mayor cantidad de focos de la histona γ H2AX en los miocardiocitos. Así mismo, se demostró una deficiencia del 50% en la reparación de extremos no homólogos (NHEJ) en el tejido cardiaco de dichos ratones, debido a la interacción aberrante entre γ H2AX y progerina (22).

Regulación molecular de la hipertrofia de los miocardiocitos

La hipertrofia del ventrículo izquierdo está asociada con la despolarización del ventrículo izquierdo (9, 10). Este fenómeno cardiovascular es subyacente a la función de los miocardiocitos. Al presentarse un daño o sobrecarga en el corazón, independientemente de la causa, aumenta la ploidía y se enciendan cascadas de señalización asociadas con un aumento de la función cardiovascular. En consecuencia, los miocardiocitos aumentan de tamaño lo que va acompañado por el incremento de los niveles de proteínas involucradas en la contracción, como las cadenas pesadas de las miosinas, la troponina C; este fenómeno compensatorio se presenta con el fin de intentar suplir la demanda adicional de fuerza durante la eyección (11).

Si bien la hipertrofia de los miocardiocitos es parte de una respuesta normal a las necesidades del organismo, su falta de modulación puede derivar en insuficiencia cardiaca (11). A nivel molecular, los eventos que conllevan a la hipertrofia de los miocardiocitos involucran receptores de membrana, segundos mensajeros y factores de transcripción. La hipertrofia activa la expresión de genes cardiacos fetales, como el factor de transcripción GATA4 y el factor potenciador de miocitos 2, MEF-2

(conformado por 4 factores, A, B, C y D). Mediante estímulos de estrés, incluyendo la sobrecarga, se activan cascadas de señalización que terminan con la activación transcripcional de GATA4 y MEF-2 (17, 18)

Otro factor involucrado en la regulación de la hipertrofia es HDAC5. HDAC5 funciona como correpresor de MEF-2; al darse la activación de la proteína cinasa dependiente de calcio/calmodulina (PKC) y la proteína cinasa D (PKD) se promueve la fosforilación en dos serinas del N-terminal de HDAC5. HDAC5 fosforilada pierde su afinidad por MEF-2, lo que termina en su exportación nuclear a cargo de CRM1. y su secuestro en el citoplasma por la proteína 14-3-3. Esto permite que MEF-2 pueda actuar sobre sus blancos transcripcionales (19, 20).

En el corazón adulto se expresan MEF-2A y MEF-2D, los cuales forman un heterodímero. MEF-2D tiene un papel central en la remodelación patológica dependiente del estrés del corazón adulto. La ausencia de MEF-2A y MEF-2C es letal en los ratones; en cambio, los ratones *knockout* para MEF-2D si pueden desarrollarse, pero presentan una mala respuesta al estrés de sobrecarga. Además, estos ratones desarrollan una respuesta alterada a las señales de estrés que normalmente conducen a la hipertrofia cardíaca, fibrosis y activación de genes fetales (17). Tanto MEF2A como MEF2D tienen secuencias de exporte nuclear tipo NES, lo que las hace susceptibles a la inhibición farmacológica de CRM1.

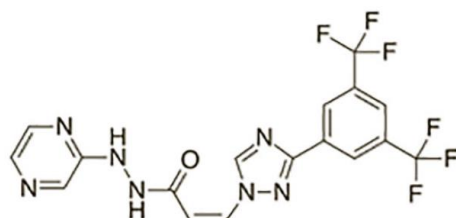
Finalmente, GATA4 es un factor de transcripción de dedos de zinc que actúa como regulador del desarrollo cardíaco en la embriogénesis. Sin embargo, es también un regulador de la hipertrofia cardíaca en adultos. A diferencia de MEF2 o HDAC5, GATA4 está sujeto a exportación nuclear independiente de CRM1 (18, 20).

Recientemente se han diseñado nuevas fármacos con la capacidad de inhibir CRM1, como selinexor (15); por lo tanto, es atractivo experimentar con selinexor para atenuar la hiperactividad aberrante de CRM1 que se presenta en el envejecimiento patológico y normal.

Inhibición de CRM1: Selinexor

El selinexor es un fármaco clasificado como inhibidor selectivo de la exportación nuclear (SINE). El cual actúa uniéndose a CRM1 en la región que reconoce la secuencia de exportación nuclear (NES) de las proteínas cargo, específicamente se une a la Cys528. A pesar de que Leptomicina B y selinexor comparten el mismo residuo blanco sobre CRM1, el selinexor es una molécula sintética pequeña (*Figura 2*), por lo que ocupa menos espacio del surco de CRM1 que se une a las NES. Así mismo, el selinexor no se hidroliza al unirse a CRM1, ni forma un puente salino, por lo que la unión con CRM1 es reversible. Esto explica la toxicidad reducida del selinexor en comparación con la Leptomicina B (15).

El selinexor es un fármaco aprobado por la FDA que se ha utilizado como tratamiento para diferentes tipos de cáncer, incluyendo el melanoma. Si comparamos los efectos secundarios y toxicidad de selinexor con la Leptomicina B, el primero resulta ser un mejor candidato para inhibir selectivamente a CRM1 debido a que no presenta efectos adversos graves.



Selinexor (KPT-330)

Figura 2. Estructura química de Selinexor.

Imagen tomada de Ferreira. *et al.* (2020) (15)

Selinexor como tratamiento para modulación cardiovascular en HGPS

En el HGPS, la desregulación del transporte núcleo-citoplasma debida a la sobreexpresión de CRM1, podría estar implicado en el desarrollo de hipertrofia cardiaca. Como se mencionó anteriormente, HDAC5 el principal modulador de los genes GATA4 y MEF-2, factores que promueven la hipertrofia (20). Se esperaría que

la inhibición de CRM1 inhibiera la hipertrofia cardiaca, ya que se bloquearía la exportación nuclear de HDAC5, y al mantenerse en el núcleo actuaría reprimiendo la expresión de MEF2 y GATA4. Mientras

Como se mencionó antes, el tratamiento con selinexor sobre los fibroblastos de pacientes con HGPS fue suficiente para aliviar varias de las alteraciones celulares asociadas con la senescencia, y para inducir la degradación de progerina (14). Por lo tanto, el tratamiento con selinexor podría ser efectivo para aliviar el daño cardiaco del ratón *Lmna* p.G609G.

JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte de los pacientes con HGPS. Por lo que el desarrollo de terapias que restablezcan la función cardiaca es una prioridad en la clínica del HGPS. En este contexto, el uso experimental del modelo murino Lmna p.G609G es necesario para la identificación de fármacos cardio-protectores. Con base a los antecedentes descrito previamente, proponemos que el tratamiento del ratón progeroide con selinexor permitirá restablecer la transportación nuclear de proteínas y disminuir la cantidad de progerina en el corazón, lo que consecuentemente aliviará su disfunción cardiaca.

HIPOTESIS

El tratamiento con selinexor aliviará el daño cardiaco del ratón progeroide.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el daño cardiaco del ratón modelo del HGPS y evaluar el efecto de la inhibición farmacológica de CRM1 sobre la histopatología del corazón.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Caracterizar la histopatología del corazón del ratón progeroide Lmna^{G609G/G609G} y evaluar el efecto del tratamiento con selinexor.
- Analizar la localización y nivel de proteínas marcadores de daño cardiaco en el ratón silvestre y Lmna^{G609G/G609G} antes y después del tratamiento con selinexor.
- Evaluar el nivel de CRM1 en el tejido cardiaco del ratón silvestre y Lmna^{G609G/G609G}.

MATERIALES Y METODOS

Animales

La cepa del ratón progeroide $Lmna^{G609G/G609G}$ se alojó en la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio del CINVESTAV. Se obtuvieron ratones heterocigotos $Lmna^{G609G/+}$ mediante cruza con el ratón isogénico silvestre (WT). Los ratones homocigotos mutantes se obtuvieron mediante la cruce de ratones hembra y machos heterocigotos. Los ratones homocigotos mutantes se genotipificaron por PCR empleando oligonucleótidos específicos.

Tratamiento farmacológico

Los ratones homocigotos de 6 semanas se dividieron en dos grupos experimentales: grupo control tratado con vehículo (PVP Plasdon-Polaxámero) (n=6), grupo tratado con Selinexor eludido en el vehículo (n=6). El Selinexor se administró dos veces por semana mediante sonda oral a una dosis de 2.5 mg por kg de peso y el tratamiento abarco hasta el punto final experimental (105 días). Se llevó a cabo un seguimiento semanal de los animales midiendo parámetros fisiológicos: peso, talla corporal y supervivencia.

Se trabajo con un grupo control, ratones WT tratados con el vehículo. Al final del tratamiento, los ratones se sometieron a eutanasia y se les extrajo el tejido cardiaco para su procesamiento posterior.

Histología

Para los análisis histológicos y de inmunofluorescencia los tejidos cardiacos fueron fijados en paraformaldehído al 4% por 24 horas a 4°C. Se sometieron a deshidratación a través de una serie ascendente de concentraciones de etanol. Por último, fueron embebidos en parafina y cortados en secciones secuenciales de 4µm.

Para la tinción con Hematoxilina-Eosina, los cortes transversales del tejido cardiaco se sometieron a desparafinar, rehidratación y lavados con PBS. Posteriormente se sometieron a tinción con hematoxilina por 5 minutos, seguidos de 15 segundos

enjuague en la solución bluing y 2 minutos con eosina. Finalizando con la deshidratación del tejido y su montaje en resina. Los cortes teñidos se visualizaron bajo microscopia óptica.

Inmunofluorescencia de cortes de tejido cardiaco

Los cortes transversales del tejido cardiaco fueron desparafinados, rehidratados y lavados con PBS. Para la recuperación de antígenos inducida por calor se utilizó el buffer Diva Decloaker (BioCare Medical DV2004MX). Los cortes fueron permeabilizados con solución PBS-Tritón X100 al 5% por 30 minutos, seguido del bloqueo con solución suero de caballo PBS tween 0.2% a temperatura ambiente por 1.5 horas. El anticuerpo primario se diluyó en la solución IF y se incubó toda la noche a 4°C. Los anticuerpos secundarios se incubaron temperatura ambiente por 1.5 horas. Se agregó después la mezcla de las soluciones A, B, C con glicerina (1:1) para eliminar auto fluorescencia. Los cortes teñidos se visualizaron mediante microscopia confocal.

Inmunohistoquímica de tejido cardiaco

Los cortes transversales de tejido cardiaco fueron desparafinados, rehidratados y lavados con TBS. Para la recuperación de antígenos inducida por calor se utilizó el buffer Diva Decloaker (BioCare Medical DV2004MX). Los cortes fueron permeabilizados con solución PBS-Tritón X100 al 5% por 30 minutos, seguido del bloqueo con solución suero de caballo TBS tween 0.2% a temperatura ambiente por 1.5 horas. El anticuerpo primario se diluyó en la solución IF y se incubó toda la noche a 4°C. Se agregó la enzima HRP (peroxidasa de rábano, por sus siglas en inglés) a una dilución 1:1 con TBS por 1.5 horas. Para llevar a cabo la reacción química, se reveló utilizando el sustrato DAB (32µL de DAB por cada 1000 µL de suero para DAB). El tiempo de revelado fue específico para cada proteína. Se realizó contra tinción con hematoxilina de Gills por 5 min, seguidos de 10 lavados con ácido acético glacial incubando por 1

min con solución bluing. Para concluir con la deshidratación de los tejidos y su montaje con resina.

Aglutinado germinal de trigo (WGA)

La aglutinina de germen de trigo es una lectina que reconoce los carbohidratos de las glicoproteínas que conforman la membrana celular, permitiendo de esta manera delimitar la superficie de las células en el tejido. Esta tinción es ampliamente utilizada para delimitar el área celular de los miocardiocitos, y de esta manera permitir la medición de su área celular. . Para las inmunofluorescencias se empleó una dilución de 1:400 en el buffer IF y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente.

Western Blot

Los tejidos cardíacos de los ratones que se recolectaron tras su disección fueron congelados inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenados a -70°C hasta su uso. Para la extracción de proteínas, los tejidos congelados fueron pulverizados en un mortero y transferidos enseguida a un tubo eppendorf de 1.5 mL nuevo para disgregarlo con el dispositivo Thomas Scientific Pestle Motor Mixer (Thermo Fisher Scientific NC1002749), utilizando el buffer RIPA. Una vez homogenizado el tejido se dejó incubando por 10 min a 4°C . Seguidamente, las muestras se centrifugaron a 16,000g por 10 min a 4°C y se obtuvo el sobrenadante. El contenido proteico fue cuantificado por la técnica de Bradford (BIORAD 500-0205).

El extracto proteico fue sometido a separación por electroforesis SDS-PAGE por 2 horas a 100v cargando 50 μg de proteína por carril. Por consiguiente, las proteínas separadas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa por 1 hora a 20v. La membrana transferida fue bloqueada con caseína al 5% por 1 hora. El anticuerpo primario monoclonal (Tabla 1) se incubó a 4°C toda la noche. El anticuerpo secundario policlonal se incubó por 1 hora a temperatura ambiente. El resultado fue revelado utilizando el equipo C-Digit Blot Scanner.

Tabla 1. Anticuerpos

NOMBRE	CASA COMERCIAL	DILUCIÓN	Origen
MEF-2D (H-11)	Santa Cruz Biothecnology. sc-271153	IF: 1:100	Ratón
MEF-2A (B-4)	Santa Cruz Biothecnology. sc-17785	IF: 1:100	Ratón
CRM1 25	NOVUS NB100-79802	WB: 1:4,000 IF: 1:400	Conejo
GAPDH (6C5)	Santa Cruz Biothecnology. sc-32233	WB: 1:8,000	Ratón
Troponina C	INVITROGEN PA5116462	WB: 1:1,000	Conejo
Lamina A/C (2A1) 32 Y 76	Santa Cruz Biothecnology sc-517580	IF 1:300	Ratón
BNP	ABCAM ab236101	IF: 1:400	Conejo
Progerina	ABCAM Ab66587	IF: 1:250	Ratón

IF; inmunofluorescencia

WB; western blot

RESULTADOS

Análisis histopatológico del corazón de los ratones silvestres y *Lmna*^{G609G/G609G}

Como primer análisis se comparó la morfología del corazón. Se observó que los corazones de los ratones *Lmna*^{G609G/G609G} tratados solamente con el vehículo, tuvieron un menor tamaño y peso en comparación con los corazones de los ratones silvestres (WT) (*Figura 3a*). Se observó además en los corazones de los ratones progeroides la pérdida de la estructura de los ventrículos, y la carencia de la forma cónica de la punta del corazón, en comparación con el ratón WT. El análisis histológico del corazón mediante la tinción con hematoxilina y eosina de secciones de cortes longitudinales reveló la morfología de los dos principales grupos celulares que conforman al tejido cardiaco: los miocardiocitos y los fibroblastos cardiacos.

Los miocardiocitos de los ratones silvestres presentan núcleos alargados en forma de bacilos, ubicados preferentemente en el centro de los miocardiocitos (*figura 3b, flechas amarillas*), mientras que los núcleos de los fibroblastos cardiacos tienen formas más esféricas y de menor tamaño, localizándose principalmente en la periferia de los miocardiocitos (*figura 3b, flechas azules*). Se observó una distribución uniforme de las fibras cardiacas con su morfología característica empantalonada. Interesantemente, el análisis del corazón de los ratones *Lmna*^{G609G/G609G} reveló una distribución no uniforme de las fibras cardiacas; al observarse la morfología nuclear de los miocardiocitos encontramos pleomorfismo, núcleos con distintos tamaños y con formas aberrantes (protuberancias, curvaturas, e invaginaciones).

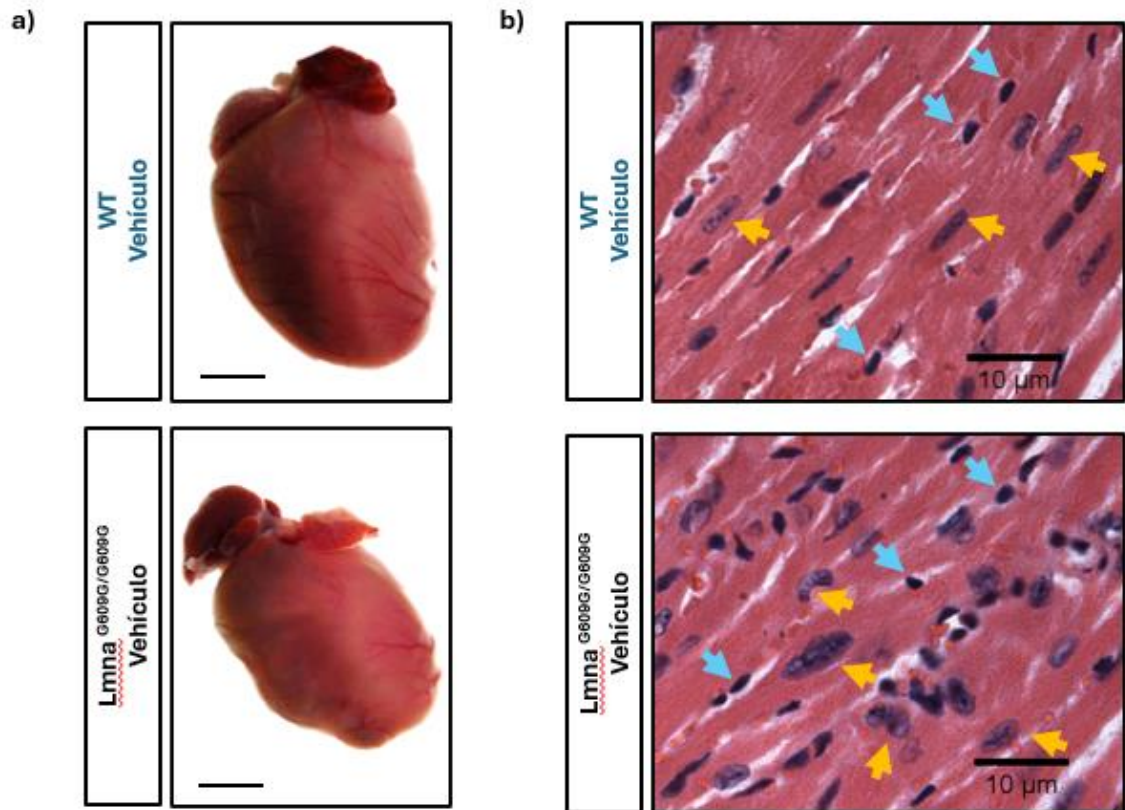


Figura 3. Análisis histopatológico del tejido cardíaco de los ratones WT y $Lmna^{G609G/G609G}$. Los grupos experimentales se trataron con el vehículo solamente. **a)** Fotografías que muestran la vista anterior de los corazones diseccionados de los ratones silvestres (WT) y $Lmna^{G609G/G609G}$. **b)** Microfotografías representativas de cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina de los ratones silvestres (WT) y $Lmna^{G609G/G609G}$. Las flechas amarillas indican núcleos de miocardiocitos, mientras que las flechas azules señalan núcleos de fibroblastos cardíacos. (n=4 ratones)

El tratamiento con selinexor aumentó el peso del corazón de los ratones $Lmna^{G609G/G609G}$

Con la finalidad de discernir si el tratamiento con selinexor tiene un benéfico sobre la histopatología del corazón del ratón progeroide, se trataron con este fármaco los dos grupos experimentales (*ver Métodos*). Al analizarse visualmente los corazones de los ratones mutantes tratados con selinexor se observó una recuperación de la morfología externa del corazón, principalmente la estructura cónica y la conformación de los ventrículos, lo que asemeja a la morfología externa del corazón del ratón WT (*Figura*

4a). Encontramos de igual manera que los corazones de los ratones progeroides tratado con selinexor presentaron un aumento de peso estadísticamente significativo, en comparación con los corazones del ratón $Lmna^{G609G/G609G}$ tratado con el vehículo (Figura 4b).

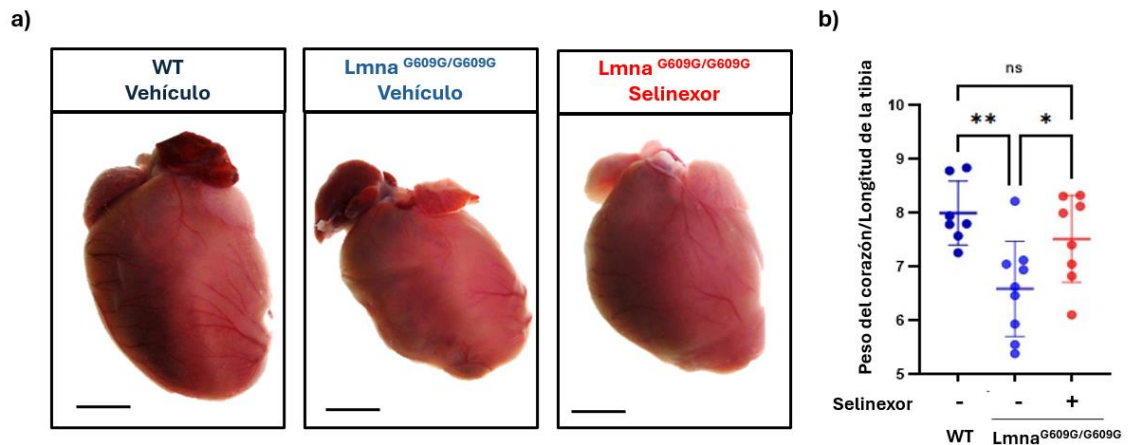


Figura 4. Análisis de la morfología y peso de los corazones de los ratones WT y $Lmna^{G609G/G609G}$ tratados con selinexor o el vehículo. a) Fotografías de vista anterior de los corazones diseccionados de los ratones WT y $Lmna^{G609G/G609G}$ tratados con selinexor o el vehículo. **b)** Peso relativo del corazón (mg) con relación a la longitud de la tibia (mm) (n>7 ratones por grupo experimental).

El tratamiento con selinexor disminuyó el número de núcleos aberrantes de los miocardiocitos del ratón $Lmna^{G609G/G609G}$

Decidimos analizar si el tratamiento con selinexor tiene un efecto sobre la morfología nuclear aberrante que presentan los miocardiocitos de los ratones $Lmna^{G609G/G609G}$. Después de la tinción de los cortes histológicos con hematoxilina y eosina se encontró alrededor de 90% de núcleos aberrantes en los miocardiocitos de los ratones $Lmna^{G609G/G609G}$ tratados con vehículo (Figura 5a) y de manera relevante, observamos una disminución de alrededor del 60% de núcleos aberrantes después del tratamiento con selinexor (Figura 5b). Se observó cierta similitud morfológica entre los núcleos de los ratones $Lmna^{G609G/G609G}$ tratados con selinexor y los que poseen los miocardiocitos de los ratones silvestres. La recuperación de la morfología nuclear como respuesta al tratamiento con selinexor se confirmó mediante ensayos de inmunofluorescencia

dirigidos contra la lámina A/C, proteína de la envoltura nuclear (*Figura 5a, panel inferior*).

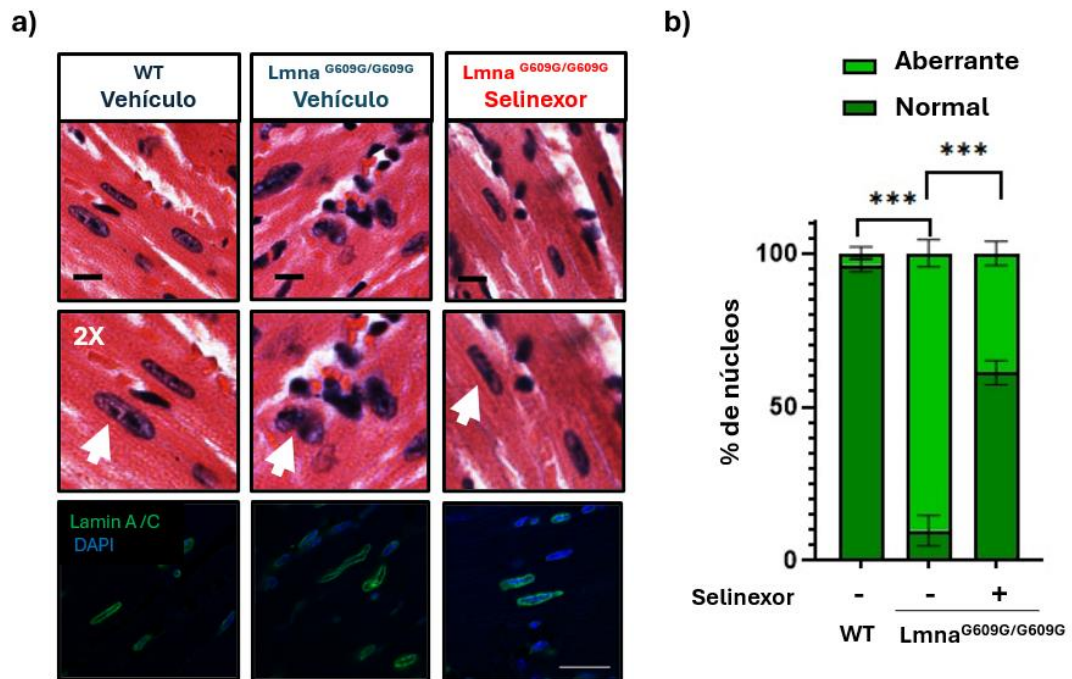


Figura 5. Disminución de núcleos aberrantes en los miocardiocitos del ratón Lmna^{G609G/G609G} tratado con selinexor. a) Microfotografías representativas de cortes histológicos longitudinales teñidos con hematoxilina y eosina de ratones silvestres y Lmna^{G609G/G609G} tratados con selinexor o el vehículo (40x). Imagen de Inmunofluorescencia para la lámina A/C representativa, tomada por microscopio confocal. b) Porcentaje de núcleos aberrantes (n=4 ratones por grupo experimental, se analizaron 4 secciones diferentes y se cuantificaron 100 núcleos por sección).

El tratamiento con selinexor disminuyó el número de núcleos positivos a progerina en los miocardiocitos del ratón Lmna^{G609G/G609G}

Tomando en consideración que la presencia de progerina es la causante de la pérdida de la arquitectura nuclear, se decidió analizar si la inmunotinción para progerina disminuía tras el tratamiento con selinexor. Con este fin, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo dirigido contra la progerina (*Figura 6a*). Enseguida se cuantificó el número de núcleos positivos y negativos para la marca fluorescente de la progerina, y se encontró una disminución del 30% de núcleos

positivos para progerina después del tratamiento con selinexor, en comparación con los núcleos de los ratones $Lmna^{G609G/G609G}$ tratados solamente con el vehículo (*Figura 6b*).

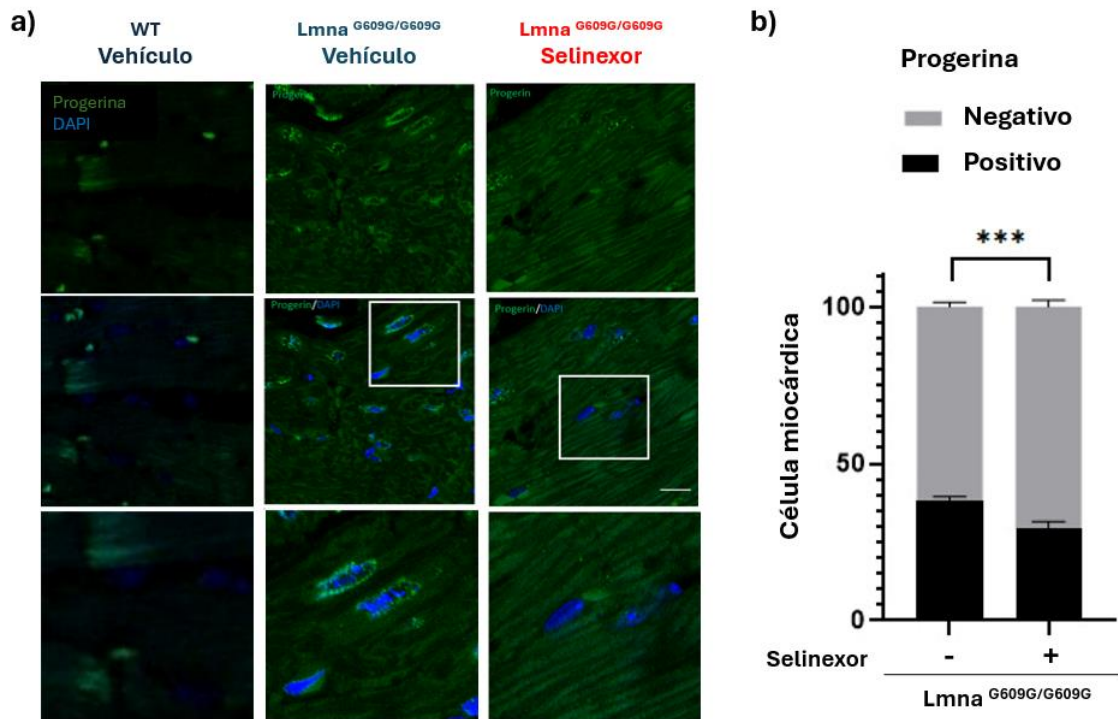


Figura 6. Los núcleos positivos para progerina disminuyeron como respuesta al tratamiento con selinexor. a) Imagen de microscopio confocal representativa de un corte longitudinal de tejido cardíaco para analizar la localización de progerina mediante inmunofluorescencia, tomada con microscopio confocal. (n=3). b) Cuantificación del número de células positivas y negativas para progerina (n=70 núcleos por condición experimental de tres ratones diferentes).

El tratamiento con selinexor disminuyó el área transversal de los miocardiocitos del ratón $Lmna^{G609G/G609G}$

Debido a la diferencia de tamaño entre los corazones de los ratones silvestres y progeroides, procedimos a evaluar el área de las fibras cardíacas. Para lo cual se utilizó la tinción con WGA (aglutinado germinal de trigo, por sus siglas en inglés), las lectinas del trigo reconocen los carbohidratos de las glicoproteínas de las membranas celulares.

Se midió el área de 300 miocardiocitos de un total de 3 ratones independientes por grupo experimental. Encontramos que los miocardiocitos del ratón $Lmna^{G609G/G609G}$ presentan un área menor en comparación con los miocardiocitos del ratón silvestre (*Figura 7a y 7b*). De manera inesperada, observamos que el tratamiento con selinexor provoca una disminución adicional en el área de los miocardiocitos del ratón $Lmna^{G609G/G609G}$ (*Figura 7a y 7b*).

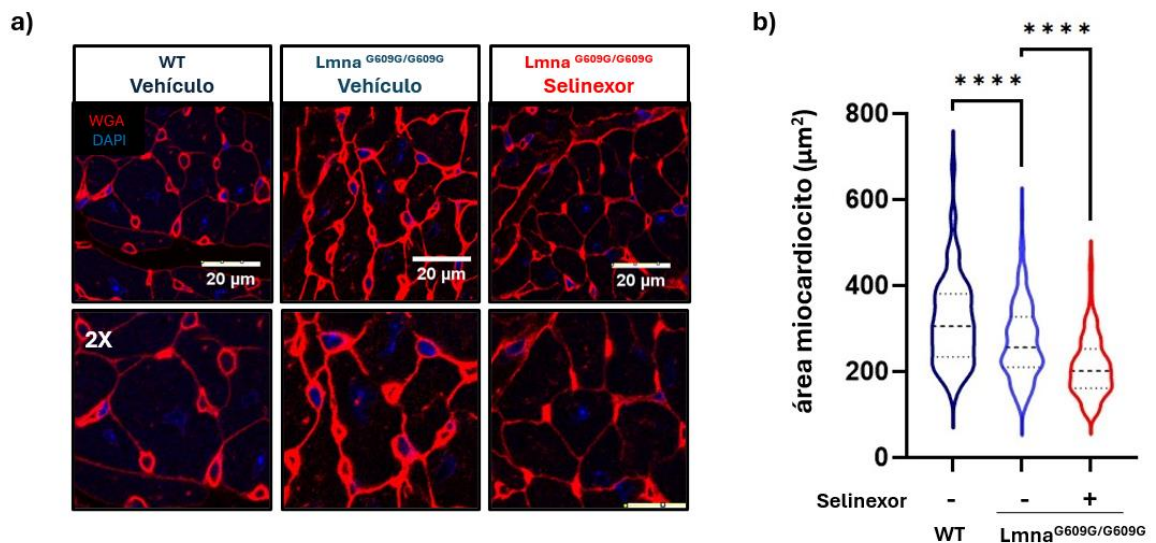


Figura 7. Análisis del área transversal de los miocardiocitos de los ratones silvestre (WT) y $Lmna^{G609G/G609G}$ tratados con selinexor o con el vehículo solamente. a) Imagen representativa de microscopia confocal que muestra cortes transversales de ventrículo izquierdo de los diferentes grupos experimentales teñidos con WGA (rojo) y contrateñidos con DAPI (azul) para visualizar los núcleos. **b)** Cuantificación del área transversal de los miocardiocitos de los tres grupos experimentales (n=300 células de 3 ratones por grupo experimental).

El tratamiento con selinexor recuperó el área longitudinal de los miocardiocitos del ratón $Lmna^{G609G/G609G}$

De manera intrigante, el área de las fibras cardiacas de los ratones progeroides tratados con selinexor es menor en comparación con las fibras del ratón progeroide tratado con el vehículo solamente, a pesar de que los corazones adquieren un tamaño y peso mayor

como respuesta al selinexor. Para resolver este enigma se decidió medir el área de las fibras cardiacas sobre cortes longitudinales del tejido cardiaco, Interesantemente, encontramos que las fibras cardiacas de los ratones progeroides tratados con selinexor tienen un área mayor que las de los ratones progeroides tratados con el vehículo solamente (*Figura 8a y 8b*). Para comprobar que el aumento del área se debía en realidad a un mayor número de sarcómeros, evaluamos el nivel de la Troponina C mediante Western Blot. De acuerdo con nuestra premisa, observamos una mayor cantidad de Troponina C en los lisados del corazón de los ratones $Lmna^{G609G/G609G}$ tratados con selinexor, en comparación con los ratones $Lmna^{G609G/G609G}$ tratados con el vehículo solamente (*Figura 8c*)

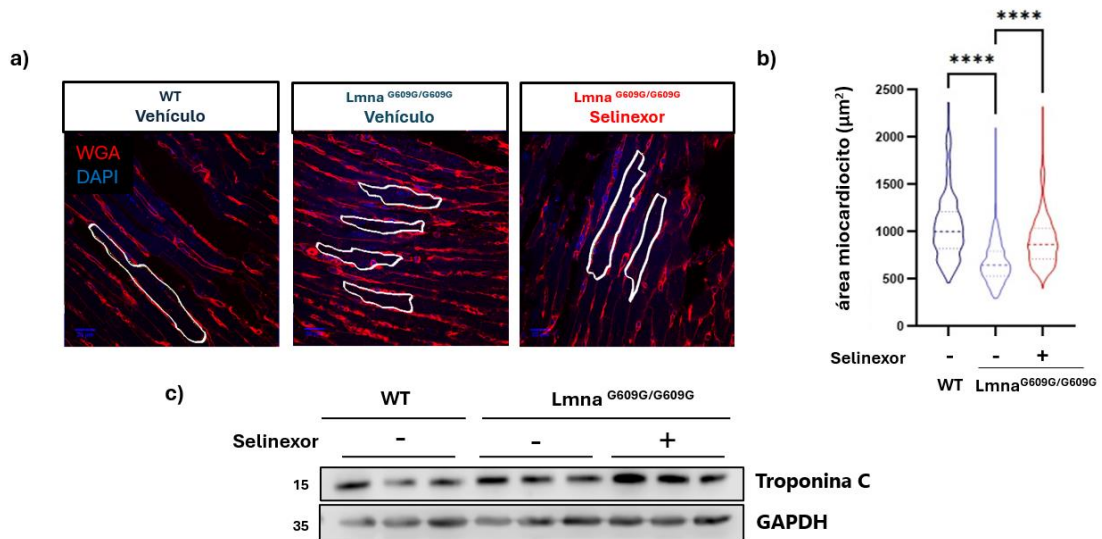


Figura 8. Aumentó del área longitudinal de los miocardiocitos del ratón $Lmna^{G609G/G609G}$ como respuesta al selinexor a) Imágenes de microscopia confocal representativas que muestran cortes longitudinales de tejido cardiaco teñidos Con WGA (rojo) y contrateñidos con DAPI (azul) para decorar los núcleos. En blanco se delimitada el área de los miocardiocitos. b) Cuantificación del área longitudinal de los miocardiocitos de los tres grupos experimentales. (n=100 células de tres ratones independientes por grupo experimental). c) Análisis de la abundancia de la troponina C mediante Western Blot, empleando GAPDH como control de carga. (n=3).

BNP esta sobreexpresado en los miocardiocitos del ratón $Lmna^{G609G/G609G}$ pero disminuye después del tratamiento con selinexor

Tomando en consideración las anomalías que exhibe el tejido cardíaco de los ratones progeroides, y el alivio de la histopatología del corazón que se observa como respuesta al tratamiento con selinexor, nos propusimos a evaluar la expresión de factores de daño cardíaco. En primer lugar, analizamos el péptido natriurético de tipo B (BNP), el cual es sintetizado por los miocardiocitos ventriculares como respuesta a un mayor volumen ventricular y sobrecarga de presión. Cuando existe disfunción cardíaca se presentan fallas en la contracción de los miocardiocitos, y dicho evento dispara la producción de BNP para compensar la demanda que causa el daño cardíaco. Se evaluaron los niveles de BNP a través de la técnica de inmunohistoquímica. La marca de color café indica la presencia de BNP, y un aumento en la tonalidad del color café indica una mayor cantidad de este péptido. Los núcleos se tiñeron con hematoxilina de Gills (color azul). Observamos una tinción más intensa de BNP en los cortes histológicos de los ratones $Lmna^{G609G/G609G}$, en comparación con los de los ratones silvestres, e interesantemente, los cortes histológicos de los ratones $Lmna^{G609G/G609G}$ tratados con selinexor mostraron una disminución clara de BNP, en comparación con los ratones progeroides tratados con el vehículo solamente (*Figura 9*).

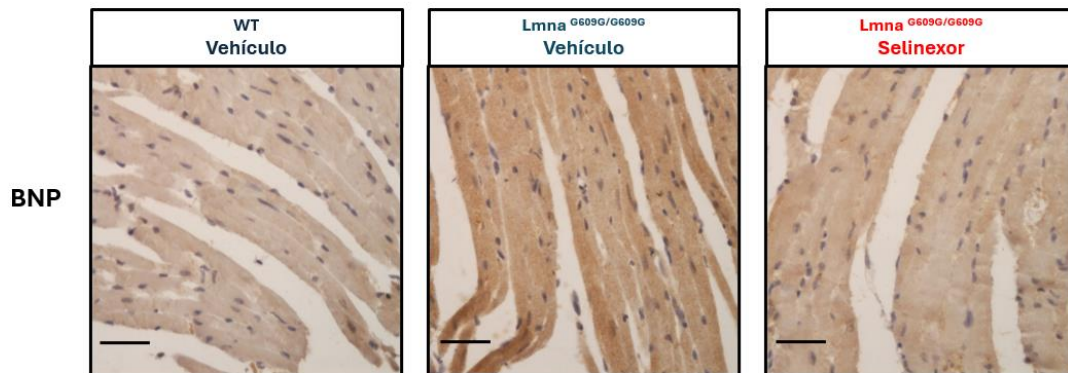


Figura 9. BNP se encuentra sobreexpresado en los ratones $Lmna^{G609G/G609G}$ y disminuye tras el tratamiento con selinexor. Imágenes de inmunohistoquímica dirigidas por BNP (40x). (n=3 experimentos independientes por cada grupo experimental)

Los factores Mef2d y Mef2a se encuentran disminuidos en el miocardio del ratón Lmna^{G609G/G609G} pero se recuperan después del tratamiento con selinexor

Los factores de transcripción Mef2d y Mef2a regulan el desarrollo y función del tejido cardíaco mediante su acción transcripcional sobre genes involucrados en la contracción y crecimiento cardíaco. Para evaluar los niveles de estos factores de transcripción se realizó la técnica de inmunohistoquímica, empleando contra tinción con hematoxilina de Gils para decorar lo núcleos en color azul. Observamos la inmunotinción de Mef2d y Mef2a en los núcleos de los miocardiocitos del ratón silvestre (*Figura 10*), lo que indica que tienen expresión basal en condiciones normales. De manera inesperada, no observamos inmunotinción para ninguno de estos factores de transcripción (Mef2d y Mef2a) en los miocardiocitos del ratón Lmna^{G609G/G69G} tratado con el vehículo solamente (*Figura 10*). Interesantemente, encontramos una tinción nuclear intensa para ambos factores, Mef2d y Mef2a, en los miocardiocitos del ratón progeroide tratado con selinexor, lo que indica que se reactivó su expresión como respuesta a la droga (*Figura 10*).

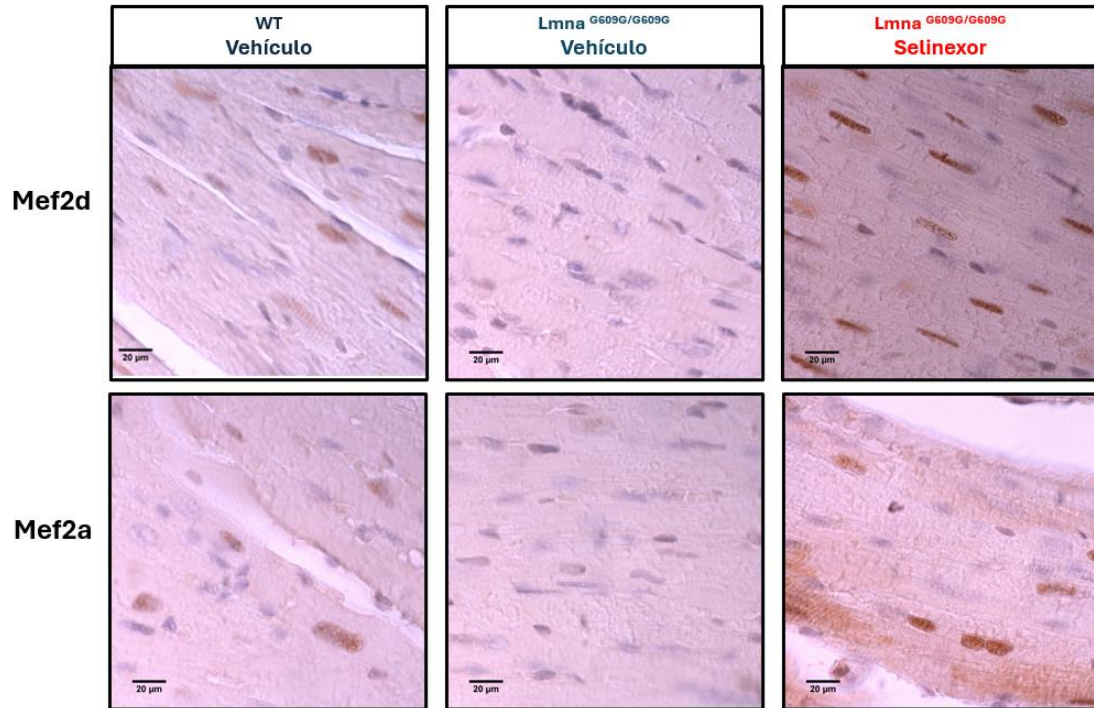


Figura 10. Análisis de los factores Mef2d y Mef2a en el corazón de los ratones silvestres y Lmna^{G609G/G609G} tratados con selinexor o con el vehículo solamente. Se muestran imágenes representativas de los ensayos de inmunohistoquímica dirigidas contra Mef2d y Mef2a (color café). Los núcleos se tiñeron con hematoxilina de Gils (azul); Resolución, 100x. (n=2 experimentos independientes).

La exportina CRM1 se localiza mayoritariamente en el núcleo de los miocardiocitos del ratón Lmna^{G609G/G609G}

Además de inhibir farmacológicamente a CRM1, el selinexor promueve la degradación de CRM1 a través de la proteasoma. Por lo tanto, procedimos a evaluar la localización y nivel de CRM1 en los miocardiocitos de los ratones progeroides. Observamos una mayor señal de CRM1 en los núcleos de los miocardiocitos del ratón Lmna^{G609G/G609G}, en comparación con los núcleos de los ratones silvestres (*Figura 11a y 11b*). Así mismo, encontramos que el tratamiento con selinexor aumenta aún más la localización nuclear de CRM1 en los ratones Lmna^{G609G/G609G}, en comparación con lo que ocurre en los núcleos de los miocardiocitos del ratón progeroide tratado solamente con el vehículo (*Figura 11a y 11b*). Posteriormente, se midieron los niveles proteicos de CRM1

mediante Western Blot en los lisados de corazón de los diferentes grupos experimentales. Enigmáticamente, encontramos una mayor cantidad de CRM1 en el corazón de los ratones $Lmna^{G609G/G609G}$ después del tratamiento con selinexor (*Figura 11c y 11d*).

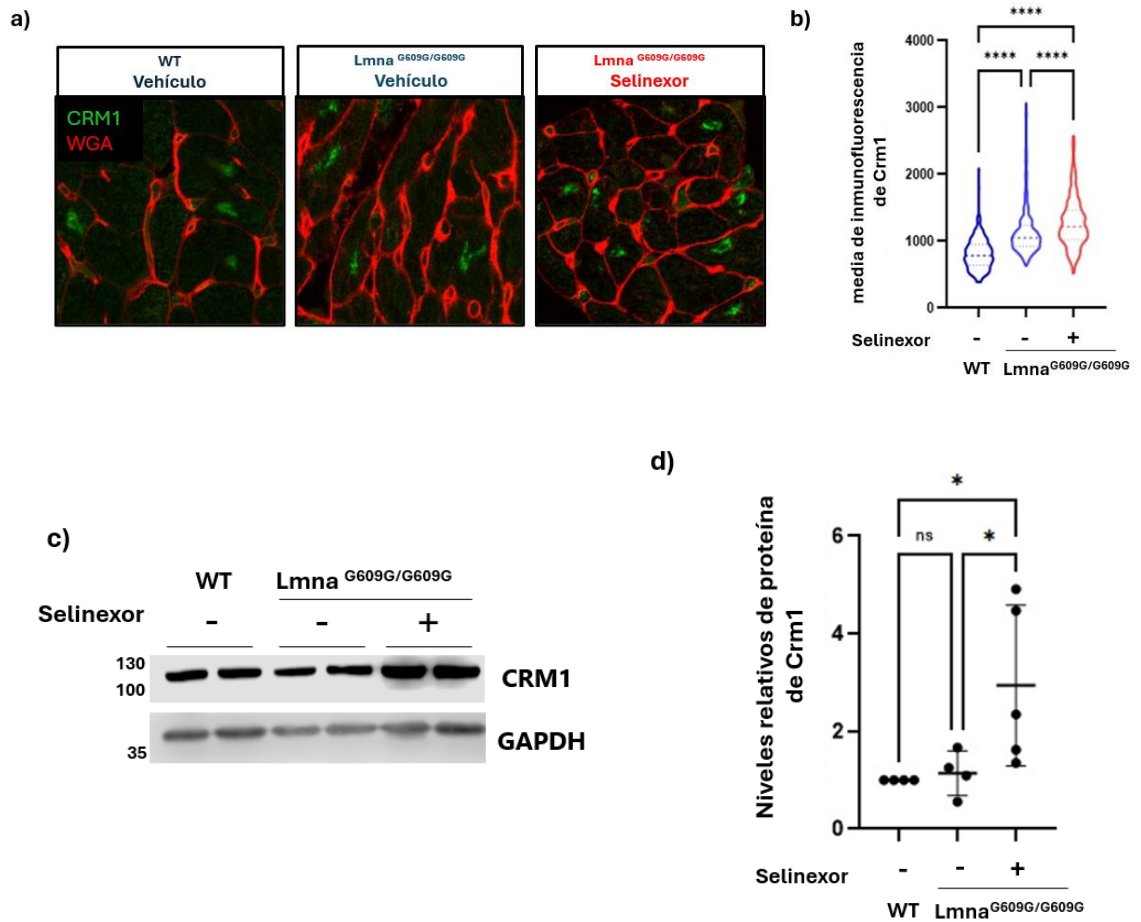


Figura 11. Localización y expresión de CRM1 en los miocardiocitos de los ratones progeroides. **a)** Imágenes representativas de microscopia confocal de cortes transversales del ventriculo izquierdo de los ratones silvestres y progeroides tratados con selinexor o con el vehiculo solamente que muestran la localización de CRM1 (color verde). La tinción con WGA se observa en rojo. **b)** Cuantificación de la media de intensidad de fluorescencia de los nucleos de los miocardiocitos de los tres grupos experimentales (n=100 células de 3 ratones experimentales). **c- d)** Análisis de los niveles proteicos de CRM1 mediante Western Blot. Se utilizó GAPDH como control de carga; (n>4 experimentos independientes).

DISCUSIÓN

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte de los pacientes con HGPS, por lo que es relevante la caracterización de fármacos con actividad cardioprotectora. En el contexto del daño cardiovascular presente en el HGPS, se cuenta con mayores reportes sobre la caracterización del sistema vascular. Se ha descrito que la presencia de progerina, variante mutante de la lámina A y causante del HGPS, provoca aterosclerosis generalizada y pérdida de células del músculo liso cardiaco. Estas alteraciones resultan en rigidez vascular, calcificación y fibrosis arterial (19,20). Hasta fechas recientes se han empezado a caracterizar las alteraciones que sufre el tejido cardiaco por la presencia de progerina.

En el presente estudio se analizó el potencial terapéutico del selinexor, inhibidor específico de la exportina CRM1, sobre el modelo murino del HGPS, ratón $Lmna^{G609G/G609G}$; específicamente analizamos si este fármaco mitiga la histopatología del corazón de este ratón progeroide. Nuestra hipótesis se basó en que el tratamiento con selinexor retrasa la senescencia celular en cultivos de fibroblastos primarios provenientes de pacientes con HGPS, debido a su acción geroprotectora que ejecuta a dos diferentes niveles: a) por una parte atenúa la hiperactividad que exhibe la exportina CRM1 en los fibroblastos HGPS, la cual resulta de un aumento anormal de su nivel proteico y b) el selinexor activa la autofagia en los fibroblastos HGP, y este proceso se encarga de degradar a la progerina. Por lo tanto, presumimos que la acción terapéutica del selinexor se debe reflejar a nivel sistémico, favoreciendo la función cardiovascular del ratón $Lmna^{G609G/G609G}$, modelo de estudio del presente trabajo.

Como primer paso caracterizamos la histología del corazón de los ratones silvestres y los ratones progeroides, y una vez definido las características histopatológicas del ratón $Lmna^{G609G/G609G}$, evaluamos el impacto del tratamiento con selinexor. Encontramos que el ratón progeroide tiene un corazón con una masa y tamaño reducidos, y consecuentemente las fibras musculares cardíacas presentan una menor área que las del ratón silvestre. Esta atrofia cardíaca del ratón progeroide coincide con lo reportado por Chen y colaboradores en el 2023 (22). Estos autores reportaron que la disminución del área de las fibras cardíacas resulta en disfunción cardíaca y acortamiento de la

esperanza de vida de los ratones progeroides. Ellos proponen que la presencia de progerina genera acumulación de daño en el ADN, lo que conlleva al aumento de los niveles de CHK2, promoviendo la interacción entre AMPK α -LKB1, la fosforilación de AMPK α , y FOXO3a, y finalmente la activación de genes pro-atróficos. De manera interesante, estos autores encontraron que el tratamiento con Isoproterenol atenuó la atrofia cardíaca, suprimiendo la activación de AMPK α y FOXO3a, lo que resultó en un aumento del tamaño del corazón, una función cardíaca eficiente, y finalmente un aumento de la esperanza de vida de los ratones progeroides. Por nuestra parte, encontramos que el tratamiento con selinexor aumentó el tamaño del corazón del ratón progeroide, pero enigmáticamente, observamos que el área de los miocardiocitos disminuyó por el tratamiento cuando se midió en cortes transversales del tejido cardíaco. Esta contradicción fue aparentemente superada cuando medimos el área de los miocardiocitos en cortes longitudinales del corazón, donde claramente el tratamiento con selinexor aumentó la longitud de las fibras cardíacas del ratón $Lmna^{G609G/G609G}$ progeroide, en comparación con el tratamiento del ratón progeroide con el vehículo solamente.

La presencia de progerina daña la arquitectura nuclear y en concordancia con este hecho, encontramos numerosos núcleos aberrantes y núcleos positivos para progerina en los miocardiocitos del ratón $Lmna^{G609G/G609G}$. El daño de la arquitectura nuclear se asocia con pérdida de heterocromatina, mayor rigidez nuclear, presencia de daño al ADN y una mecanotransducción alterada de los miocardiocitos (23). Los miocardiocitos son células mecanosensibles, por lo que la arquitectura nuclear juega un papel importante en su contracción. De hecho, el núcleo forma parte del aparato contráctil del sarcómero, ya que contacta de manera funcional con el citoesqueleto a través del complejo LINC, el cual está conformado por las proteínas SUN1 y SUN2, quienes interactúan con las nesprinas y la lámina nuclear (23,24). Notablemente, el tratamiento con selinexor disminuyó significativamente el número de núcleos positivos para progerina en los miocardiocitos del ratón progeroide, lo que sugiere que el fármaco mantiene su habilidad para promover la degradación de progerina in vivo. La disminución de progerina resultó en el restablecimiento de la morfología nuclear, lo que presumimos que se debe reflejar en una mecanotransducción más eficiente que

permita soportar la contracción y aliviar la disfunción cardíaca. A nivel molecular especulamos que los miocardiocitos deben recuperar la heterocromatina y disminuir consecuentemente la inestabilidad genética como respuesta al tratamiento con selinexor.

Con la finalidad de evaluar los cambios moleculares que genera el tratamiento con selinexor sobre el ratón $Lmna^{G609G/G609G}$, evaluamos diferentes marcadores de función/daño cardíaco. La sobreexpresión de BNP es un indicativo de disfunción cardíaca debida a fallas en la contracción de los ventrículos. Por otra parte, los factores de transcripción Mef2d y Mef2a actúan como reguladores de la función cardíaca a través de la regulación de la expresión de componentes de los sarcómeros, como las cadenas pesadas de miosina α y β , y las troponinas cardíacas C e I (17,18,19). Observamos que el daño cardíaco que exhiben los miocardiocitos del ratón progeroide se manifiesta a través de la sobreexpresión de BNP y la ausencia de señal para los factores de transcripción Mef2a y Mef2d. Importantly, los miocardiocitos del ratón progeroide tratado con selinexor mostraron una disminución marcada de BNP y una recuperación de la señal de recuperó la señal de Mef2d y Mef2a. Los sarcómeros son el componente principal de las células musculares cardíacas debido a que son las que efectúan la contracción. Por lo que un aumento de área celular es indicativo de un mayor número de sarcómeros en el miocardiocito. Por otra parte, los factores de transcripción Mef2d y Mef2a son activadores de la hipertrofia cardíaca (18), alteración que se caracteriza por el aumento de tamaño de las fibras cardíacas como consecuencia de una demanda mecánica alta. Por lo tanto, la baja expresión de Mef2d y Mef2a en el ratón $Lmna^{G609G/G609G}$ explicaría la atrofia cardíaca, mientras que la sobreexpresión de BNP indicaría daño cardíaco severo. Importantly, el restablecimiento de la expresión de Mef2d y Mef2a después del tratamiento con selinexor sería una de las explicaciones para que los miocardiocitos del ratón progeroide recuperarán su longitud y el corazón incrementará su peso y tamaño. Así mismo, el incremento de la Troponina C implicaría una remodelación de los sarcómeros, lo que es consistente con el aumento de la masa cardíaca que ocurre como respuesta al selinexor. Finalmente, la disminución de BNP es indicativa de que se alivió el daño cardíaco como respuesta al selinexor. No obstante, se requiere evaluar la funcionalidad de corazón mediante ecocardiografía en

los diferentes grupos experimentales, con la finalidad de comprobar el efecto cardioprotector del selinexor sobre el ratón progeroide.

Por lo que respecta a CRM1, se ha descrito que el selinexor induce la degradación de CRM1 por vía proteosomal (25); por lo tanto, el aumento de CRM1 que se observó en el corazón del ratón progeroide después del tratamiento con selinexor es contradictorio. Se requieren análisis posteriores para determinar si el efecto del selinexor sobre la estabilidad de CRM1 es célula- y/o tejido-especifico.

CONCLUSIÓN

Selinexor

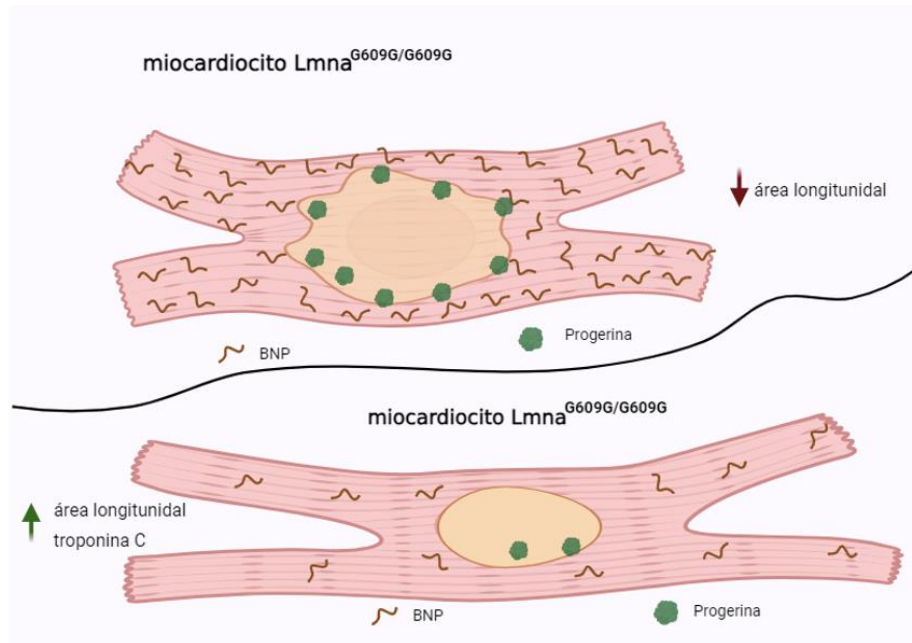


Figura 12. Efecto del tratamiento con selinexor sobre los miocardiocitos del ratón Lmna^{G609G/G609G}.

-El tratamiento con selinexor disminuyó los niveles de progerina y el número de núcleos aberrantes en los miocardiocitos del ratón progeroide.

-El tratamiento con selinexor mejoró la morfología del corazón y aumentó el área longitudinal de los miocardiocitos.

El tratamiento con selinexor recuperó el tamaño y peso del corazón al sobreexpresar los factores de transcripción Mef2d y Mef2a.

El tratamiento con selinexor contrarrestó el daño cardíaco mediante la disminución de los niveles de BNP, marcador de insuficiencia cardíaca,

BIBLIOGRAFÍA

1. da Silva PFL, Schumacher B. Principles of the Molecular and Cellular Mechanisms of Aging. *J Invest Dermatol*. 2021;141(4S):951-60.
2. Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell*. 2023;186(2):243-78.
3. Benarroch L, Cohen E, Atalaia A, Ben Yaou R, Bonne G, Bertrand AT. Preclinical Advances of Therapies for Laminopathies. *J Clin Med*. 2021;10(21).
4. Lamis A, Siddiqui SW, Ashok T, Patni N, Fatima M, Aneef AN. Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome: A Literature Review. *Cureus*. 2022;14(8):e28629.
5. Dittmer TA, Misteli T. The lamin protein family. *Genome Biol*. 2011;12(5):222.
6. Hennekam RC. Hutchinson-Gilford progeria syndrome: review of the phenotype. *Am J Med Genet A*. 2006;140(23):2603-24.
7. Gonzalo S, Kreienkamp R, Askjaer P. Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome: A premature aging disease caused by LMNA gene mutations. *Ageing Res Rev*. 2017;33:18-29.
8. Merideth MA, Gordon LB, Clauss S, Sachdev V, Smith AC, Perry MB, et al. Phenotype and course of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *N Engl J Med*. 2008;358(6):592-604.
9. Osorio FG, Navarro CL, Cadinanos J, Lopez-Mejia IC, Quiros PM, Bartoli C, et al. Splicing-directed therapy in a new mouse model of human accelerated aging. *Sci Transl Med*. 2011;3(106):106ra7.
10. Benedicto I, Dorado B, Andres V. Molecular and Cellular Mechanisms Driving Cardiovascular Disease in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome: Lessons Learned from Animal Models. *Cells*. 2021;10(5).
11. Nakamura M, Sadoshima J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nat Rev Cardiol*. 2018;15(7):387-407.
12. Ahn J, Jo I, Kang SM, Hong S, Kim S, Jeong S, et al. Structural basis for lamin assembly at the molecular level. *Nat Commun*. 2019;10(1):3757.
13. García-Aguirre I, Monterrubio-Ledezma F, Alamillo-Iniesta A, Castro-Obregón S, Cisneros B. Molecular Basis of Progeroid Diseases. *Clinical Genetics and Genomics of Aging2020*. p. 187-211.
14. Garcia-Aguirre I, Alamillo-Iniesta A, Rodriguez-Perez R, Velez-Aguilera G, Amaro-Encarnacion E, Jimenez-Gutierrez E, et al. Enhanced nuclear protein export in premature aging and rescue of the progeria phenotype by modulation of CRM1 activity. *Aging Cell*. 2019;18(5):e13002.
15. Ferreira BI, Cautain B, Grenho I, Link W. Small Molecule Inhibitors of CRM1. *Front Pharmacol*. 2020;11:625.
16. Cisneros B, Garcia-Aguirre I. Nuclear protein export pathway in aging therapeutics. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(6):4682-4.
17. Kim Y, Phan D, van Rooij E, Wang DZ, McAnally J, Qi X, et al. The MEF2D transcription factor mediates stress-dependent cardiac remodeling in mice. *J Clin Invest*. 2008;118(1):124-32.
18. Suzuki YJ. Cell signaling pathways for the regulation of GATA4 transcription factor: Implications for cell growth and apoptosis. *Cell Signal*. 2011;23(7):1094-9.
19. Vega RB, Harrison BC, Meadows E, Roberts CR, Papst PJ, Olson EN, et al. Protein kinases C and D mediate agonist-dependent cardiac hypertrophy through nuclear export of histone deacetylase 5. *Mol Cell Biol*. 2004;24(19):8374-85.

20. Harrison BC, Roberts CR, Hood DB, Sweeney M, Gould JM, Bush EW, et al. The CRM1 nuclear export receptor controls pathological cardiac gene expression. *Mol Cell Biol.* 2004;24(24):10636-49.
21. Kang, S. M., Seo, S., Song, E. J., Kweon, O., Jo, A. H., Park, S., Woo, T. G., Kim, B. H., Oh, G. T., & Park, B. J. (2023). Progerinin, an Inhibitor of Progerin, Alleviates Cardiac Abnormalities in a Model Mouse of Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *Cells*, 12(9), 1232. <https://doi.org/10.3390/cells12091232>
22. Chen, Y., Huang, S., Cui, Z., Sun, X., Tang, Y., Zhang, H., Chen, Z., Jiang, R., Zhang, W., Li, X., Chen, J., Liu, B., Jiang, Y., Wei, K., & Mao, Z. (2023). Impaired end joining induces cardiac atrophy in a Hutchinson–Gilford progeria mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 120(47). <https://doi.org/10.1073/pnas.2309200120>
23. Kalukula, Y., Stephens, A. D., Lammerding, J., & Gabriele, S. (2022). Mechanics and functional consequences of nuclear deformations. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 23(9), 583–602. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00480-z>
24. Coscarella, I. L., Landim-Vieira, M., Rastegarpouyani, H., Chase, P. B., Irianto, J., & Pinto, J. R. (2023). Nucleus mechanosensing in cardiomyocytes. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(17), 13341. <https://doi.org/10.3390/ijms241713341>
25. Kwanten, B., Deconick, T., Walker, C., Wang, F., Landesman, Y., & Daelemans, D. (2023). E3 ubiquitin ligase ASB8 promotes selinexor-induced proteasomal degradation of XPO1. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 160, 114305. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114305>