



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Comparación del efecto terapéutico de dos inhibidores de la
exportación nuclear en el Síndrome de Progeria”**

TESIS

Que presenta:

M. en C. LUZ ADRIANA SOTO PONCE

Para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS

En la especialidad de:

GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Director de Tesis

Dr. Bulmaro Cisneros Vega

Ciudad de México

Enero, 2025

INDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	4
Síndrome progeroide de Hutchinson-Gilford	4
La lamina A/C y la progerina	5
Tráfico nuclear en HGPS	8
CRM1 como un blanco terapéutico	8
LMB y HGPS	9
Otros inhibidores de CRM1	10
Selinexor: un inhibidor selectivo y reversible de CRM1	11
ANTECEDENTES	12
JUSTIFICACIÓN	13
HIPÓTESIS	14
OBJETIVOS	15
Objetivo general	15
Objetivos específicos	15
MATERIALES Y MÉTODOS	16
Cultivos y tratamientos celulares.	16
Inmunofluorescencia indirecta y análisis con microscopía confocal	16
Western blot	17
Anticuerpos	19
Análisis del perfil de ciclo celular por citometría de flujo	19
Ensayo de apoptosis	20
Ensayos de proliferación celular	20
Ensayo de β -galactosidasa asociada a la senescencia (SA- β -Gal)	21
Ensayo para evaluar especies reactivas de oxígeno	21
Análisis de la morfología mitocondrial	21
Análisis estadístico	22
RESULTADOS	23
DISCUSIÓN	44
CONCLUSIONES	48

REFERENCIAS.....	49
------------------	----

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Procesamiento anormal de la lámina A en el HGPS.	6
Figura 2. Morfología nuclear de células de individuos sanos y con HGPS.....	7
Figura 3. Ensayo de viabilidad celular por MTT.....	24
Figura 4. El tratamiento con Selinexor acumula en el núcleo a la ciclina B1l y disminuye el nivel de CRM1 en los fibroblastos WT y HGPS.....	26
Figura 5. El tratamiento con Selinexor no induce apoptosis en los fibroblastos HGPS.	28
Figura 6. El tratamiento con selinexor es efectivo para aliviar las alteraciones nucleares de los fibroblastos HGPS.....	29
Figura 7. La inhibición de CRM1 mediada por selinexor previene la morfología senescente en los fibroblastos HGPS.	31
Figura 8. La inhibición de CRM1 mediada por selinexor rescata la morfología nucleolar de los fibroblastos HGPS.....	32
Figura 9. La inhibición de CRM1 mediada por selinexor recupera la heterocromatina perinuclear en los fibroblastos HGPS.....	33
Figura 10. El tratamiento con Selinexor previene que los fibroblastos HGPS entren a senescencia celular disminuyendo los niveles de las proteínas p16 y p21.	35
Figura 11. El tratamiento con Selinexor incrementó los niveles de células positivas a la tinción para la enzima β -galactosidasa asociada a senescencia en los fibroblastos HGPS.	36
Figura 12. La inhibición de CRM1 mediada por Selinexor reduce los niveles de progerina en los fibroblastos HGPS.	37
Figura 13. Efecto de Selinexor sobre la progerina a través del tiempo.	38
Figura 14. El tratamiento con Selinexor no afecto los niveles de las láminas A y C en los fibroblastos HGPS-1.	39
Figura 15. El tratamiento de los fibroblastos HGPS-1 con LMB no afecto la progerina	40
Figura 16. El tratamiento con Selinexor alivió la morfología mitocondrial aberrante de los fibroblastos HGPS.	43
Figura 17. El tratamiento con Selinexor disminuyó la generación de especies reactivas de oxígeno intracelulares (ROS) en los fibroblastos HGPS.....	44

RESUMEN

El síndrome de progeria Hutchinson-Gilford (HGPS) ocasiona envejecimiento prematuro y acelerado debido a la expresión de progerina, variante dominante mutante de la lámina A. La progerina se ancla aberrantemente a la envoltura nuclear alterando diversos procesos celulares, lo que a su vez induce senescencia. En nuestro grupo de trabajo, demostramos previamente que la exportación nuclear dirigida por CRM1 está anormalmente acelerada en los fibroblastos derivados de pacientes con HGPS, debido a la sobre-expresión de CRM1. Además, observamos que la inhibición farmacológica de CRM1 utilizando leptomicina B (LMB) rescata el fenotipo senescente de los fibroblastos HGPS, lo que indica que CRM1 es un potencial blanco terapéutico contra HGPS1. Sin embargo, LMB tiene una alta toxicidad por lo que es limitado su uso clínico. En este trabajo se utilizó el fármaco selinexor, un inhibidor selectivo de CRM1 que posee baja toxicidad, para probar el efecto gero-protector de la inhibición farmacológica de CRM1. Demostramos mediante ensayos de viabilidad celular que el selinexor es menos tóxico que LMB para los fibroblastos silvestres y HGPS. De manera interesante, el tratamiento con selinexor alivio la senescencia de los fibroblastos de pacientes con HGPS, como se mostró mediante ensayos bioquímicos y de biología celular. En las células HGPS tratadas con selinexor se redujo los niveles de las ciclinas p16 y p21, las cuales promueven el arresto celular; se aliviaron las alteraciones morfológicas de la célula, el núcleo, la mitocondria, y el nucleolo, y se redujo el nivel de especies reactivas de oxígeno. Así mismo, el selinexor promovió la degradación de progerina. En resumen, el tratamiento con selinexor ejerce su acción anti-senescente mediante la recuperación de la proteostasis y la eliminación de la progerina, lo que apoya la noción de que la modulación farmacológica de CRM1 constituye una terapia emergente contra el HGPS.

ABSTRACT

Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS) causes premature and accelerated aging due to the expression of progerin, a dominant mutant variant of lamin A. Progerin is aberrantly anchored to the nuclear envelope altering several cellular processes, which in turn induces senescence. In our group, we previously demonstrated that the CRM1-mediated nuclear protein export is abnormally accelerated in fibroblasts derived from HGPS patients due to CRM1 overexpression. Furthermore, we observed that pharmacological inhibition of CRM1 using leptomycin B (LMB) rescues the senescent phenotype of HGPS fibroblasts, indicating that CRM1 is a potential therapeutic target against HGPS1. However, LMB has high toxicity, so its clinical use is limited. In this work, we used the drug selinexor, a selective inhibitor of CRM1 that has low toxicity, to test the geroprotective effect of pharmacologically inhibiting CRM1. We demonstrated by cell viability assays that selinexor is less toxic than LMB to wild-type and HGPS fibroblasts. Interestingly, selinexor treatment alleviated the senescence of fibroblasts from HGPS patients, as shown by biochemical and cell biology assays. In HGPS cells treated with selinexor, the levels of cyclins p16 and p21, which promote cell arrest, were reduced; morphological alterations of the cell, nucleus, mitochondria, and nucleolus were alleviated; and the level of reactive oxygen species was reduced. Likewise, selinexor promoted the degradation of progerin. In summary, selinexor treatment exerts its anti-senescence action through recovery of proteostasis and progerin clearance, supporting the notion that pharmacological modulation of CRM1 constitutes an emerging therapy against HGPS.

Este trabajo se realizó en el departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Doctor Bulmaro Cisneros Vega. Con el apoyo de CONAHCYT con el proyecto cuyo número de registro es 555991.

INTRODUCCIÓN

Síndrome progeroide de Hutchinson-Gilford

El envejecimiento es un proceso que afecta a la mayoría de los organismos vivos y está caracterizado por la pérdida progresiva de las funciones fisiológicas y psicológicas y una mayor vulnerabilidad que culmina con la muerte. Se conocen características del envejecimiento como la inestabilidad genómica, las alteraciones epigenéticas, el desgaste de los telómeros, la senescencia celular, la pérdida de proteóstasis, la disfunción mitocondrial, la comunicación intercelular alterada y el agotamiento de las células madre (López-Otín et al., 2013). El estudio del envejecimiento fisiológico humano se ha visto facilitado por el descubrimiento de mutaciones que causan síndromes de envejecimiento prematuro, uno de ellos es el síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford (HGPS), una enfermedad causada por defectos genéticos en la proteína de la envoltura nuclear lámina A (Kubben & Misteli, 2017). Se ha propuesto al HGPS como un modelo para estudiar la interacción entre las enfermedades asociadas con el envejecimiento prematuro y fisiológico debido a que presenta una amplia gama de defectos celulares, tisulares y orgánicos que son compartidos con el envejecimiento normal (Kubben & Misteli, 2017).

El HGPS es una enfermedad rara que afecta a alrededor de 1 de cada 4 millones de recién nacidos y no se ha encontrado ningún factor de predisposición, por lo que se considera una enfermedad esporádica. Fue descrita por primera vez por los médicos Jonathan Hutchinson y Hastings Gilford en 1886 y 1897 respectivamente. Las características clínicas de HGPS se manifiestan poco después del nacimiento e incluyen pérdida de grasa subcutánea, alopecia, sarcopenia, y distrofia ungueal, calcificaciones subcutáneas, rigidez de las articulaciones, arrugas en la piel, debilitamiento de la estructura ósea, pérdida de vista, enfermedad cardiovascular progresiva y muerte por ataques cardíacos y accidentes cerebrovasculares (Hennekam, 2006; Merideth et al., 2008).

La lamina A/C y la progerina

El HGPS es un trastorno causado por una mutación específica en el gen LMNA, que codifica las láminas A y C. La mutación es una sustitución de un solo nucleótido (c.1824C >T) dentro del exón 11 del gen LMNA que activa un sitio de empalme crítico para el procesamiento de transcritos específicos de la lámina A, lo que da como resultado la síntesis del ARNm para la prelámina A que contiene una delección interna de 150 pares de bases. Esto conduce a la traducción de una forma mutante de la lámina A llamada progerina. En su extremo C-terminal la progerina carece de 50 aminoácidos que contienen un sitio de reconocimiento para la cisteína proteinasa ZMPSTE24, enzima que elimina el grupo farnesilo C-terminal de la prelámina A para convertirla hacia lámina A madura. De esta forma la ZMPSTE24 está involucrada en el último paso del procesamiento postraduccional de la proteína prelámina A, sin embargo, debido a la falta del sitio de reconocimiento ZMPSTE24, la progerina permanece permanentemente farnesilada y adosada en la envoltura nuclear de una forma más rígida (de Sandre-Giovannoli et al., 2003; Eriksson et al., 2003; Gordon et al., 2014; Young et al., 2005).

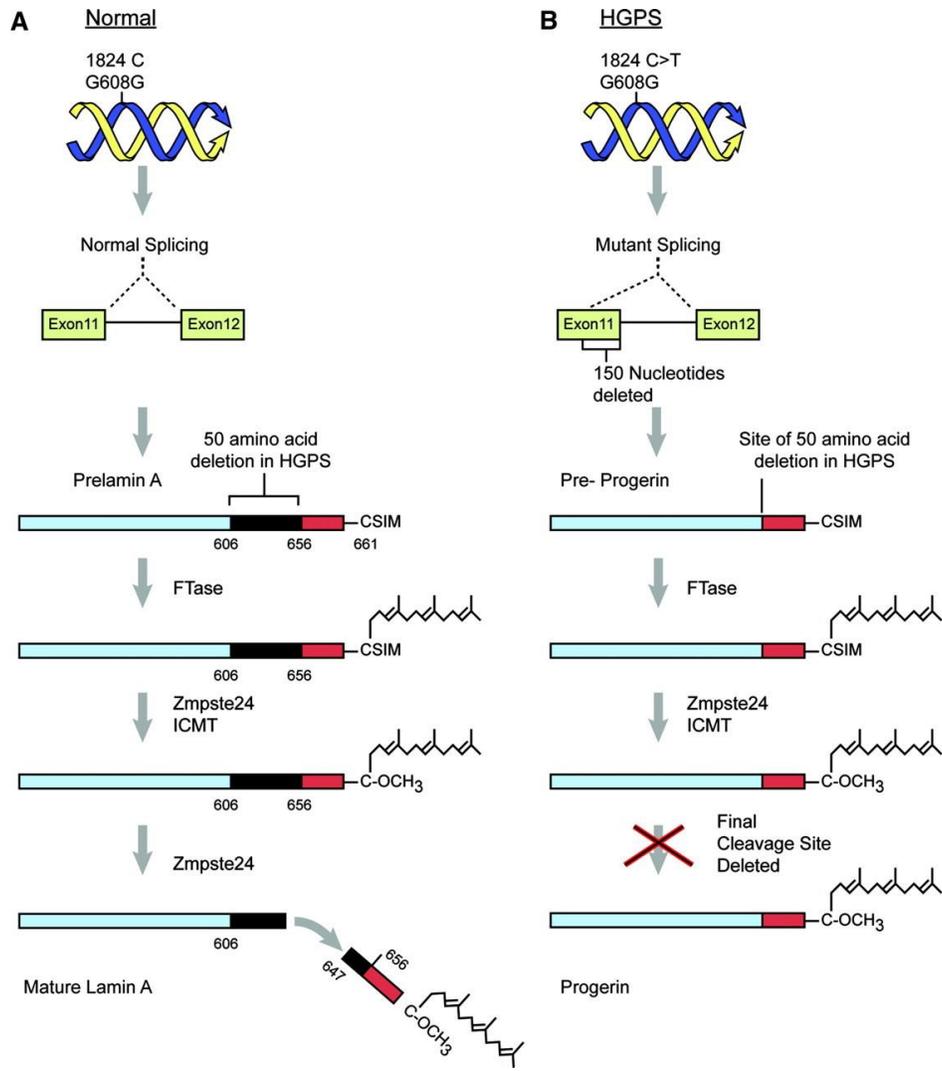


Figura 1. Procesamiento anormal de la lámina A en el HGPS. En HGPS, la mutación puntual de una citosina por una timina en la posición 1824 del codón 608 no genera un cambio en el aminoácido codificado glicina. Sin embargo, esta mutación activa un sitio de splicing críptico, 150 nucleótidos río arriba del sitio de unión usual entre el exón 11 a 12. La prelámína A, precursor de la lámina A, pasa por una serie de modificaciones post-traduccionales, incluyendo la farnesilación del motivo CAAX en su extremo carboxilo terminal (en este caso CSIM) por la enzima farnesiltransferasa (Capell et al., 2007).

La expresión de progerina ejerce efectos negativos dominantes sobre la célula, permanece unida de manera estable a la membrana nuclear interna donde induce defectos celulares complejos que incluyen anomalías morfológicas

nucleares, alteración de la expresión génica, defectos en la reparación del ADN y acortamiento de los telómeros (Gonzalo et al., 2017). Además, HGPS se asocia con cambios en la forma nuclear que incluyen lobulación de la envoltura nuclear, engrosamiento de la lámina nuclear, pérdida de heterocromatina periférica y agrupación de poros nucleares (Goldman et al., 2004). Aunque no se ha definido la base molecular de estos efectos inducidos por la progerina, está claro que están relacionados con su procesamiento postraduccional alterado (Worman et al., 2010).

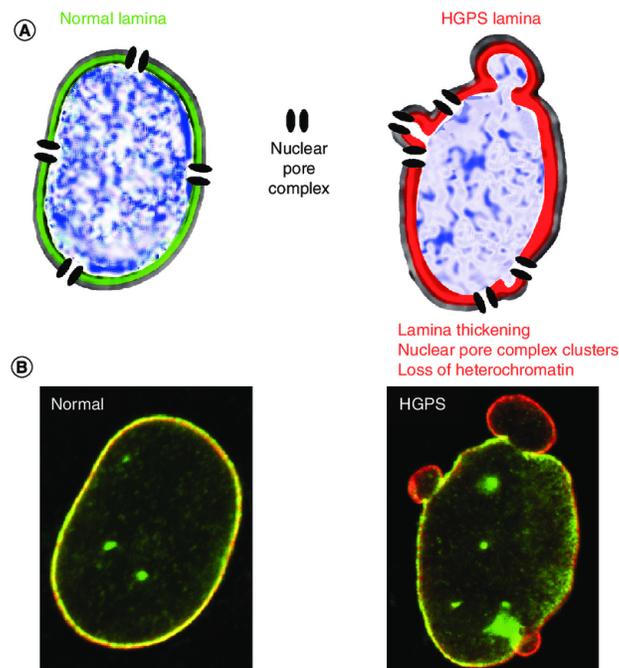


Figura 2. Morfología nuclear de células de individuos sanos y con HGPS. (A) Modelo esquemático de la lámina nuclear en un núcleo de un individuo sano (verde) y en células de un individuo con HGPS (rojo). La presencia de progerina en individuos con HGPS provoca núcleos dismórficos, ampollas en la envoltura nuclear, engrosamiento de la lámina, agrupamiento del complejo del poro nuclear y cambios en la organización de la cromatina (azul). (B) Núcleos de individuo sano y de un individuo con HGPS teñidos contra lámina A/C (rojo) y lámina B1 (verde) (Stochaj et al., 2013).

Tráfico nuclear en HGPS

Estudios relacionados con HGPS han mostrado un defecto en el sistema Ran GTPase (Kelley et al., 2011), que juega un papel central en la regulación de importación y exportación nuclear de proteínas. Ran es un regulador bien conocido de importación y exportación a través de interacciones de proteínas que son altamente específicas para sus formas GDP y GTP (Gorlich et al., 1996). La distribución nuclear/citoplasmática de Ran se altera en el HGPS, presentando una reducción significativa en el núcleo (Kelley et al., 2011).

La proteína de mantenimiento de la región cromosómica 1 (CRM1) facilita la transportación de proteínas, ARN y otras macromoléculas desde la membrana nuclear al citoplasma a través del complejo de poro nuclear (NPC), lo que ayuda a mantener la localización subcelular adecuada. CRM1 reconoce señales de exportación nuclear, secuencias (NES), las cuales son ricas en aminoácidos hidrofóbicos (Henderson, 2000; Ishizawa et al., 2015; Kudo et al., 1997).

CRM1 como un blanco terapéutico

La exportación e importación nuclear son controladas por las karioferinas y son de gran importancia como blancos terapéuticos para varias enfermedades. Se ha puesto interés especial en estudiar el cáncer, ya que las células de cáncer son más vulnerables a la inhibición de la transportación nuclear debido en gran parte a su metabolismo y proliferación celular acelerados, en comparación con células normales (Angus et al., 2014; Kuusisto & Jans, 2015). Se han desarrollado tanto inhibidores de la importación como de la exportación nuclear, siendo de interés de este trabajo resaltar el papel de los inhibidores de la exportación nuclear.

Los primeros estudios sobre la inhibición de la exportación nuclear utilizaron antibióticos como leptomicina B (LMB), anguinomicinas y ratjadone. El primer inhibidor específico de CRM1 que se descubrió fue la LMB, un antibiótico que se une covalentemente a la cisteína 528 de CRM1 por lo que inhibe irreversiblemente la interacción entre CRM1 y la NES (Nishi et al., 1994).

LMB y HGPS

Interesantemente, nuestro grupo de trabajo demostró previamente que la exportación nuclear de proteínas dirigida por CRM1 está alterada en los fibroblastos HGPS, debido a la sobreexpresión de CRM1 causada por progerina (García-Aguirre et al., 2019). Se demostró que la inhibición farmacológica de la actividad de CRM1 con LMB mejora las características de envejecimiento de las células HGPS, incluida la morfología celular senescente, la regulación a la baja de la lámina B1, la pérdida de heterocromatina, los nucléolos expandidos y los defectos de la morfología nuclear; por lo tanto, la exportación nuclear juega un papel central en el HGPS y su alteración es un sello distintivo del envejecimiento patológico y fisiológico, ya que la expresión y la actividad de CRM1 aumentan durante el envejecimiento normal también (García-Aguirre et al., 2019).

CRM1 es un blanco terapéutico potencial para el HGPS ya que diferentes proteínas que son blanco de CRM1 modulan procesos celulares importantes para el HGPS, incluido p53 que modula la senescencia celular; B23 una proteína importante para la función de nucleolos; la sirtuina 2 desacetilasa dependiente de NAD (SIRT2) que participa en la organización de la heterocromatina; y la distrofina Dp71 y el β -dístroglicano que están implicados en la función de la envoltura nuclear (Cisneros & García-Aguirre, 2020). Debido a lo anterior, la modulación farmacológica de CRM1 usando inhibidores selectivos es una terapia prometedora contra HGPS (García-Aguirre et al., 2019). Existen a la fecha diferentes tratamientos contra HGPS que se han probado en modelos celulares de HGPS: (1) LMB descrito previamente en nuestro grupo de trabajo (García-Aguirre et al., 2019);(2) MG132, un inhibidor del proteosoma que disminuyó la senescencia celular a través de la disminución de progerina y el aumento de la proliferación celular (Harhour et al., 2017); (3) inhibidores de la farnesiltransferasa, que actúan bloqueando las alteraciones causadas por la farnesilación de la progerina (Glynn & Glover, 2005); (4) rapamicina, una molécula que inhibe el complejo mTOR 1 y tiene un efecto negativo sobre el nivel de la progeria mediante la activación de la autofagia, disminuye además la senescencia celular y mejora de la morfología nuclear (Cao et al., 2011); (5) azul de metileno, mejora de la función mitocondrial,

disminuye alteraciones nucleares y la pérdida de heterocromatina (Xiong et al., 2016).

Por lo que respecta al tratamiento sobre CRM1, se requieren otras moléculas con propiedades farmacológicas superiores para medir sus efectos sobre HGPS, debido a que LMB muestra una toxicidad alta y su administración es limitada para terapia humana (Newlands et al., 1996).

Otros inhibidores de CRM1

Debido a la alta toxicidad que presentó LMB durante estudios clínicos previos, su uso fue discontinuado. Después se desarrollaron análogos a la LMB como la leptomicina A, anguinomicina A/B/C/D y ratjadonas A/C, sin embargo, ha sido limitado su uso terapéutico (Fleta-Soriano et al., 2014).

Investigaciones posteriores se enfocaron en desarrollar una clase de moléculas pequeñas inhibitoras de CRM1, también conocidos como inhibidores selectivos de la exportación nuclear (SINEs), el desarrollo de estos fármacos se basó en la estructura de CRM1 y su acoplamiento de ajuste inducido por consenso (cIFD), para minimizar el número de puntos de interacción entre el fármaco y la bolsa de unión de CRM1 ((Kalid et al., 2012; Parikh et al., 2014; Ranganathan et al., 2012; Zhang et al., 2013)

Los inhibidores selectivos de la exportación nuclear (SINE) son un grupo de moléculas sintéticas y reversibles desarrolladas recientemente por Karyopharm Therapeutics® Inc, una de ellas llamada Selinexor (KPT-330) es el primer inhibidor selectivo oral de CRM1. Al igual que LMB, Selinexor actúa uniéndose selectivamente al residuo Cys528 de CRM1, inhibiendo así la unión de CRM1 a las NESs en el surco de unión con la proteína cargo (Abdul et al., 2016), Sin embargo, en el caso de Selinexor los grupos enona hidrolizables se unen a regiones alejadas de los residuos básicos de CRM1, convirtiendo a esta molécula en un inhibidor lentamente reversible, contribuyendo así a que tenga una mejor tolerancia *in vivo*, y por la tanto una menor toxicidad (Sun et al., 2013).

Selinexor: un inhibidor selectivo y reversible de CRM1

En estudios pre-clínicos, Selinexor inhibe de forma reversible la exportación nuclear de proteínas supresoras de tumores (TSP), reguladores del crecimiento y ARNm de proteínas oncogénicas a través de la inhibición de CRM1, lo que conduce a la acumulación de TSP en el núcleo y a la disminución de oncoproteínas como c-myc y ciclina D1. Los estudios *in vitro* demostraron actividad pro-apoptótica en células de mieloma múltiple; y los modelos de xenoinjerto murino de mieloma múltiple, carcinoma de tiroides y linfoma difuso de células B grandes, demostraron así actividad antitumoral (Garg et al., 2017; Gounder et al., 2016, Zhu et al., 2019). Esta molécula fue aprobada en diciembre de 2020 por la Food and Drug Administration (XPOVIO, Kariopharm Therapeutics® Inc) para usarla en combinación con bortezomib y dexametasona para el tratamiento de pacientes adultos con mieloma múltiple refractario o en recaída (FDA, 2020).

Interesantemente, se demostró que el grupo SINE aumenta la autofagia a través del enriquecimiento nuclear de HLH-30/TFEB, lo que resulta en una longevidad mayor de *C. elegans* y protección contra neurodegeneración (Silvestrini et al., 2018) El factor de transcripción EB (TFEB) es un factor de transcripción que mejora la expresión de genes relacionados con la autofagia y de genes lisosomales (Sardiello et al., 2009; Settembre et al., 2011).

La trasportación de proteínas específicas fuera del núcleo es esencial para la regulación del ciclo celular y la proliferación de tejidos. La desregulación de este proceso puede afectar muchos otros procesos celulares, como el crecimiento tumoral, la respuesta inflamatoria, el ciclo celular y la apoptosis (Gravina et al., 2014).

ANTECEDENTES

En nuestro grupo de trabajo se demostró que CRM1 se encuentra sobre expresada en HGPS, tanto a nivel de mRNA como de proteína. Se demostró que esta alteración provoca una exportación nuclear exacerbada de proteínas con NES del núcleo hacia el citoplasma; sin embargo, esta sobreexpresión de CRM1 fue atenuada con el inhibidor leptomicina B. Se analizó el efecto del fármaco en fibroblastos de pacientes con HGPS y se reveló que después del tratamiento se atenúan diversos fenotipos asociados a la senescencia celular, como la expansión nucleolar, la pérdida de lámina B1, la morfología celular senescente, la morfología nuclear aberrante, la pérdida de la heterocromatina y el arresto del ciclo celular. Además, se demostró que la sobre-expresión de CRM1 es consecuencia de la presencia de progerina (García-Aguirre et al., 2019). Sin embargo, una gran desventaja es que LMB presenta una toxicidad alta en modelos celulares, lo que limita su uso para ensayos clínicos. Por lo tanto, diversos grupos de investigación buscan inhibidores alternativos con mejor tolerancia. Selinexor es un inhibidor selectivo de la exportación nuclear que principalmente ha sido utilizado en ensayos clínicos para el tratamiento de mieloma múltiple, cuando el tratamiento de referencia falla. A diferencia de LMB, selinexor es una molécula cuyo efecto inhibitorio sobre CRM1 es reversible, lo que pareciera ser la razón de su menor toxicidad.

En este trabajo surgió el interés de analizar el efecto de selinexor sobre los fenotipos asociados a senescencia celular y compararlos con los ya reportados para LMB. Al ser un inhibidor reversible, la hipótesis del trabajo es que el selinexor presente una menor toxicidad y que también atenúe el fenotipo senescente. Adicionalmente se analizó el efecto de selinexor sobre los niveles de progerina. El objetivo a mediano plazo del presente estudio es que la terapia basada en selinexor pueda ser trasladada a un modelo preclínico (modelo murino del HGPS).

JUSTIFICACIÓN

Estudios previos indican que leptomicina B ayuda al alivio de diversos fenotipos asociados a senescencia en HGPS, pero al ser un fármaco con una elevada toxicidad su uso terapéutico es limitado. Es necesario probar un inhibidor de CRM1 sintético que no sea tóxico para poder trasladarlo a un modelo preclínico. Para ello es necesario probar la eficacia del selinexor en un modelo celular del HGPS y evidenciar mediante un estudio comparativo si este fármaco presenta ventajas sobre LMB,

HIPÓTESIS

El tratamiento con el inhibidor de la exportación nuclear Selinexor atenuará los fenotipos asociados con la senescencia y presentará baja toxicidad en cultivos de fibroblastos primarios de individuos con HGPS.

OBJETIVOS

Objetivo general

Comparar el efecto terapéutico de dos inhibidores de la exportación nuclear (LMB y Selinexor) sobre la senescencia celular en fibroblastos de pacientes con HGPS.

Objetivos específicos

1. Probar la eficacia del selinexor LMB para inhibir la exportación nuclear de proteínas.
2. Analizar la toxicidad celular.
3. Analizar el efecto de LMB y selinexor sobre la localización y expresión de la progerina.
4. Analizar comparativamente el efecto de los inhibidores leptomicina B y Selinexor sobre la senescencia celular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos y tratamientos celulares.

Los fibroblastos dérmicos provenientes de un individuo sano (AG08469, 38 años) y de 2 individuos con la mutación para HGPS: HGPS-1 (AG11513, 8 años, femenino) y HGPS-2 (AG11498, 14 años, masculino) (Coriell Cell Repository, Camden NJ) se cultivaron como previamente fue reportado por (García-Aguirre et al., 2019). Los fibroblastos se cultivaron en medio MEM (Minimal Essential Medium Eagle; Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado con suero bovino fetal al 15 % (v/v) (Invitrogen, USA), 100 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomina (Sigma-Aldrich), y solución de piruvato de sodio 1 Mm (Sigma, Saint Louis, MO), a una temperatura de 37°C y una atmosfera saturada con agua, con 5% de CO₂. Según se indica, los fibroblastos se trataron con Selinexor 60 nM (KPT-330, Kariopharm Therapeutics Inc) durante 3 o 6 días diluidos en DMSO hasta una concentración final de 0.1 % en el medio de cultivo, o con LMB 0,15 o 50 nM (LMB, Sigma) durante 6 días, diluido en etanol como vehículo. Los cultivos controles se tratarán con el vehículo solamente. Todos los experimentos se realizaron usando cultivos de fibroblastos en pasajes entre 8 y 16.

Cultivo	Origen	Mutación LMNA	Edad del individuo donante	Género
AG08469 (WT)	Instituto Coriell	Ninguna	38	M
AG11513 (HGPS1)	Instituto Coriell	G608G	8	F
AG11498 (HGPS2)	Instituto Coriell	G608G	14	M

Inmunofluorescencia indirecta y análisis con microscopía confocal

Las células cultivadas sobre cubreobjetos se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 10 min en PBS, se permeabilizaron y bloquearon durante 10 min con la solución amortiguadora IF (0,1 % Triton X-100, 0,02 % SDS y 10 mg/ml de BSA) en PBS a temperatura ambiente. Después se incubó durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios correspondientes. Al día siguiente, las células se lavaron con Tritón X-100 al 0,1% en PBS durante 5 min y después con PBS solo 10 veces, seguido de lavados con H₂O otras 10 veces, antes de ser incubadas durante 1 h a

temperatura ambiente con el correspondiente fluorocromo- anticuerpo secundario conjugado (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Según se indique, la actina F se marcó utilizando faloidina conjugada con TRITC (Sigma-Aldrich) diluida 1:150 en la solución buffer IF durante 15 min a temperatura ambiente. Después, las células se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente con 0,2 µg/ml de diamino-2-fenilindol (DAPI; Sigma-Aldrich) en PBS para la visualización de los núcleos. Después del lavado, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con VectaShield (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA) y se examinaron en un microscopio de barrido láser confocal (CLSM; Eclipse Ti Series, Nikon Corporation Healthcare Business Unit, Japón) usando un objetivo de inmersión en aceite 63x (NA=1.2). Los análisis de las imágenes digitalizadas se llevaron a cabo utilizando el programa ImageJ versión 1.49 (Wayne Rasband National Institutes of Health, EE. UU. <http://imagej.nih.gov/ij>). El análisis morfométrico de los núcleos también se realizó con el software ImageJ, las imágenes se calibraron y se convirtieron a una escala de grises de 8 bits para establecer el umbral para la selección de núcleos. El área nucleolar de > 1,000 nucléolos se cuantificaron en proyección máxima utilizando un complemento de contador de objetos 3D, midiendo el área de la sección transversal ocupada por la tinción B23 con el software ImageJ. Los parámetros de área nuclear y circularidad se calcularon como se reportó anteriormente (García-Aguirre et al., 2019). El análisis cuantitativo para determinar la proporción nuclear a citoplásmica de fluorescencia (F n/c) se analizó utilizando ImageJ. Para analizar los focos de heterocromatina (marcador H3K9me3), se utilizó la función Find Maxima de ImageJ, como se describió anteriormente (Zhang et al., 2013). Los datos se representaron utilizando el software GraphPad Prism versión 8.

Western blot

Los cultivos de fibroblastos se sembraron en cajas de 100 mm de diámetro y se centrifugaron, se lavaron con PBS pH 7,4 y se resuspendieron en 130 µL de la solución de lisis (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8,0, Triton X-100 al 1%, PMSF 1 mM, 1 % SDS, Na₅VO₄ 2 mM, NaF 25 mM, NaMO₃O₄ 10 mM y cóctel de

inhibidores completos de proteasa 1X) durante 20 min. Posteriormente, las muestras se sonicaron a 3,5 micrones en Soniprep 150, aplicando 3 ciclos de 15 s cada uno, con intervalos de descanso de 30 s entre cada ciclo de sonicación. Las muestras de proteína se colectaron después de centrifugar durante 3 min y 10 000 rpm a 4 °C. La concentración de proteína se determinó mediante el protocolo de Bradford. Se mezclaron 50 µg de la alícuota del lisado de proteínas con buffer 6X (2-mercaptoetanol 10 %, SDS 4 %, glicerol 20 %, Tris-HCl pH 6,8 0,125 M y azul de bromofenol 0,004 %), y se calentaron durante 5 min a 100° C. Cuando se indique, las muestras se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 10 % SDS o Tricina al 8 %, usando la solución de electroforesis (glicina 250 mM pH 6,8, Tris-base 25 mM y SDS al 0,01 %) o solución de tricina (Tricina 50 mM, 50 Tris-Base mM y NaHSO₃ 1,3 mM pH 8,24) respectivamente. Luego, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0,45 µm (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA) utilizando una cámara de transferencia semiseca (Bio-Rad Laboratories) durante 1 h, utilizando buffer de transferencia (Tris-base 48 mM, glicina 39 mM SDS 0,037% y metanol 20%).

Posteriormente, las membranas se tiñeron con solución de rojo Ponceau y se bloquearon en TBS-T (Tris-HCl 100 mM pH 8,0, NaCl 150 mM y Tween-20 al 0,5 % (v/v)) con leche en polvo baja en grasa al 5 %, en agitación durante 1 h a temperatura ambiente y luego se incubaron durante la noche a 4 ° C en agitación con los anticuerpos primarios apropiados. Después de esto, las membranas se lavaron con TBST y se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano apropiados (anticuerpo IgG anti-conejo de cabra F(ab')₂, HRP (AQ132P, Sigma Aldrich) o anticuerpo IgG anti-ratón de conejo F(ab')₂.)₂, HRP (AQ160P, Sigma Aldrich). La señal de proteína específica se visualizó usando el sistema de detección de transferencia Western Enhanced Chemiluminescence (ECL™) (Western Lightning Plus-ECL, Enhanced chemiluminescence sustrato, Perkin Elmer), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Las imágenes de transferencia se adquirieron con un escáner de transferencia de imágenes Western blot digital, C-Digit® Blot Scanner (LI-COR

Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA.), y se sometieron a análisis densitométrico con el programa Image Studio. Los valores de la proteína de interés se estandarizaron con los valores de la proteína de control de carga (actina). Los datos se representaron gráficamente usando el programa GraphPad Prism versión 8.

Anticuerpos

Anticuerpo		Origen	IF	WB
Lámina A/C	Abcam (ab8984)	Ratón monoclonal	1:200	1:10 000
Progerina	Santa Cruz Biotechnology (sc-81611)	Ratón monoclonal	1:50	1:300
B23	Thermo Fisher Scientific (FC- 61991)	Ratón monoclonal	1:100	N/A
Ciclina B1	Santa Cruz Biotechnology (sc-752)	Conejo polyclonal	1:25	N/A
H3K9me3	Abcam (ab8898)	Conejo polyclonal	1:500	N/A
Actina	Dr. Manuel Hernández, Cinvestav México	Ratón monoclonal	N/A	1:3000
Lámina B1	Abcam (ab16048)	Conejo polyclonal	1:300	N/A
CRM1	Novus Biologicals (NB100-79802)	Conejo monoclonal	1:100	1:4000
p16	Santa Cruz Biotechnology (sc-377412)	Ratón monoclonal	NA	1:300
p21	Cell Signaling Technology (2946S)	Conejo monoclonal	NA	1:300

Análisis del perfil de ciclo celular por citometría de flujo

Los fibroblastos WT, HGPS-1 y HGPS-2 se cultivaron en cajas de 60 mm y se trataron con Selinexor, LMB o con el vehículo correspondiente. Posterior al

tratamiento, los cultivos se lavaron dos veces con PBS y se tripsinizaron con tripsina diluida 1:2 y después se centrifugaron (1300 rpm) durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, el sedimento se resuspendió y se fijó con etanol frío al 80 % durante 30 min a 4 °C; para visualizar el contenido de DNA se tiñó con 1 µg/ml de DAPI (Sigma-Aldrich) durante 30 min en la oscuridad y a temperatura ambiente. Después de eso, las muestras se transfirieron a tubos de citómetro de flujo y se analizó el ciclo celular en un citómetro de flujo BD LSR-Fortessa (BD Biosciences, San Jose, CA, EE. UU.), utilizando el programa ModFit LT (Verity Software House, Topsham, ME). Los datos se representaron utilizando el programa GraphPad Prism versión 8.

Ensayo de apoptosis

Los fibroblastos WT, HGPS-1 y HGPS-2 se cultivaron en cajas de 60 mm y se trataron con Selinexor, LMB o con el vehículo correspondiente. Posterior al tratamiento, los cultivos se lavaron dos veces con PBS y se tripsinizaron con tripsina diluida 1:2 y después se centrifugaron (1300 rpm) durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se resuspendió el sedimento y se trasladaron las células al citómetro (lo más pronto posible para no afectar la viabilidad). Previo a la captura del citómetro, se agregaron 50 µL de la solución de anticuerpos del kit FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I, BD Pharmingen (1µL de anexina V + 1µL de Ioduro de propidio en 100 µL de la solución de unión 1X) a la muestra, después la mezcla se resuspendió e incubó durante 5 min, a temperatura ambiente en oscuridad y a temperatura ambiente. Finalmente se analizaron las muestras en el citómetro de flujo BD LSR-Fortessa (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA).

Ensayos de proliferación celular

Los diferentes cultivos de fibroblastos se sembraron por triplicado en microplacas de 12 pozos. La proliferación celular se midió durante 6 días utilizando el kit comercial MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-5-difeniltetrazolio bromuro) (Sigma-Aldrich), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ensayo de β -galactosidasa asociada a la senescencia (SA- β -Gal)

Las células sembradas en cubreobjetos se tiñeron con SA- β -Gal (Senescent Cell Histochemical Staining Kit, Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se observaron las células teñidas de color azul que expresan la enzima β -galactosidasa (células senescentes) bajo microscopía de campo claro.

Ensayo para evaluar especies reactivas de oxígeno

Los diferentes cultivos de fibroblastos se sembraron por triplicado sobre placas de cultivo de 35 mm con fondo de vidrio y se tiñeron con DCFDA/H2DCFDA - Cellular ROS Assay Kit (Abcam, ab113851), siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de 3 días de tratamiento con Selinexor, los cultivos WT, HGPS-1 y HGPS-2 se lavaron dos veces con la solución 1x y después se tiñeron durante 45 min a 37°C agregando 40 μ M de DCFDA diluido en medio de cultivo en la oscuridad. Durante los últimos 10 minutos se añadió el colorante Hoechst (1 μ g/ml) para visualización de núcleos. Posteriormente se lavaron dos veces con la solución 1x. La placa con las células teñidas se colocó sobre una cámara húmeda con 5% de CO₂ adaptada al microscopio confocal. Se observaron células vivas bajo microscopía de fluorescencia, con el filtro apropiado para fluoresceína (FITC). Las células fluorescentes corresponden a la producción de especies reactivas de oxígeno.

Análisis de la morfología mitocondrial

Los fibroblastos WT, HGPS-1 y HGPS-2 se cultivaron en cajas p35 con fondo de cristal a una confluencia del 78-80% y se tiñeron con MitoTracker™ Green FM (Thermo Fisher Scientific, M7514). Después de 3 días de tratamiento con Selinexor, WT, HGPS-1 y HGPS-2, los cultivos se sincronizaron durante 12 h con medio bajo en suero (0,1 %) suplementado con Selinexor y transcurridas 12 h se colocó medio con suero al 10 %. Al finalizar el tratamiento, se retiró el medio y se realizaron 2 lavados con PBS. Enseguida, se agregó medio nuevo con suero al 10% y con MitoTracker Green FM diluido en medio de cultivo para una concentración final de 100 nM y las muestras se incubaron por 20 min. Durante los últimos 10 minutos se

añadió el colorante Hoechst a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ para visualización de núcleos, a una temperatura de 37°C y una atmosfera saturada con agua y con 5% de CO₂. Finalmente, se retiró el medio con el MitoTracker, se realizaron 2 lavados con PBS y se agregó medio nuevo con suero al 10%. La caja con las células teñidas se montó en una cámara húmeda con 5% de CO₂ adaptada al microscopio confocal. Las células se incubaron en la cámara húmeda durante 5 minutos y se capturaron las imágenes de mitocondrias teñidas, empleando microscopía de fluorescencia con el filtro apropiado para fluoresceína.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism versión 8 (San Diego) y la prueba t de Student no pareada de dos colas. Los datos representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes, y los valores de $p < 0,05$ se tomaron como estadísticamente significativos. Cuando se indica, los análisis estadísticos se realizaron utilizando la prueba U de Mann-Whitney no paramétrica exacta o la prueba t no pareada, y los datos se representaron por la media \pm SEM, o la media \pm DE (desviación estándar de la media) de una serie de tres experimentos independientes: los valores de $p < 0,05$ se consideraron como estadísticamente significativos.

RESULTADOS

El Selinexor presenta una menor toxicidad que leptomicina B en las células WT y HGPS

Un primer paso para evaluar la capacidad de Selinexor para mitigar las marcas senescentes de los fibroblastos HGPS, fue el establecimiento de una dosis eficaz y segura del compuesto a través del cálculo de la concentración inhibidora IC50. Se determinó la IC50 de LMB a modo de comparación. Se llevaron a cabo ensayo MTT para evaluar viabilidad celular. Este compuesto se utiliza para medir la actividad metabólica celular como un indicador de viabilidad, proliferación y citotoxicidad celular. Este ensayo colorimétrico se basa en la reducción de la sal amarilla de tetrazolio (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio o MTT) a cristales de formazán de color púrpura por parte de células metabólicamente activas. Con estos resultados calculamos la mitad de la concentración inhibitoria máxima (IC50) que indica cuánto fármaco se necesita para afectar la viabilidad celular en un 50%. El valor IC50 es una medida útil para fijar una concentración no toxica de un fármaco de interés.

Los fibroblastos WT y HGPS-1 se trataron con concentraciones de selinexor desde 10 nM a 3 μ M durante 6 días, lo que resultó en una IC50 de 81.47 nM para los cultivos WT, y 67.72 nM para los cultivos HGPS-1. A continuación, analizamos los fibroblastos WT y HGPS-1 tratados con LMB con concentraciones desde 0.1 nM hasta 0.5 nM, lo que resultó en una IC50 de 0.224 nM para las células WT, y de 0.187 nM para las células HGPS-1 (Figura 1). Estos resultados demostraron que el cultivo de HGPS-1 tuvo una sensibilidad más alta que las células WT para ambos compuestos; sin embargo, las células HGPS-1 presentaron una sensibilidad más baja para selinexor que para LMB. Los resultados de la IC50 del selinexor revelan que este fármaco presenta una toxicidad menor que LMB. Con base en estos resultados, fijamos una concentración de trabajo para selinexor por debajo de su IC50 (60 nM) para llevar a cabo los experimentos siguientes.

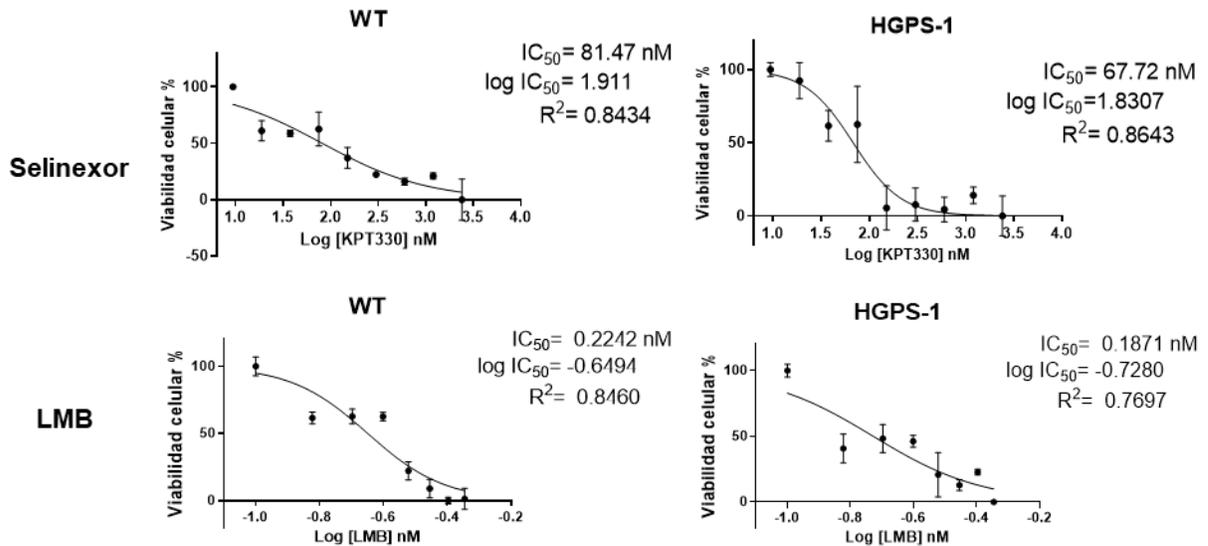


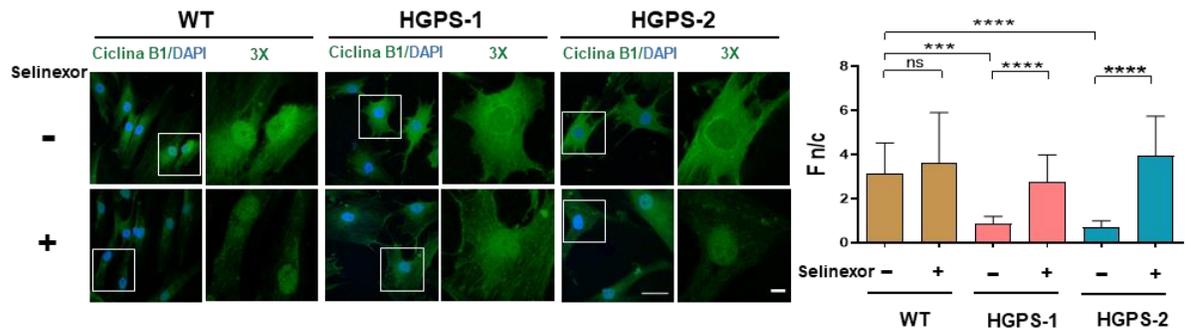
Figura 3. Ensayo de viabilidad celular por MTT. Los fibroblastos WT y HGPS-1 fueron cultivados en cajas de 96 pozos y tratados durante 6 días con las concentraciones indicadas de Selinexor y LMB. Después, la viabilidad de las células fue medida por ensayos MTT para calcular la IC₅₀ de cada componente.

El tratamiento con selinexor reduce los niveles de CRM1 y acumula en el núcleo a una proteína que contiene NES en los fibroblastos WT y HGPS

Para evaluar el efecto inhibitorio de selinexor y LMB sobre la actividad de CRM1, se analizó la distribución subcelular de ciclina B1, una proteína cuya exportación nuclear depende del reconocimiento de su NES por CRM1. Se evaluaron mediante microscopía confocal dos cultivos de fibroblastos HGPS (HGPS1 y HGPS-2) y un cultivo control (WT) después de un tratamiento con 60 nM de Selinexor por 1 día. Observamos que la acumulación nuclear de ciclina B1 se recuperó en ambos cultivos de fibroblastos HGPS tras el tratamiento con Selinexor (Figura 4B) o con LMB (datos no mostrados). El análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia nuclear/citoplasmática (F n/c) confirmó estas observaciones (Figura 4B, panel derecho). Por lo tanto, una concentración <IC₅₀ de Selinexor fue suficiente para bloquear la exportación nuclear de ciclina B1. Enseguida, determinamos si el tratamiento de las células WT y HGPS con selinexor provoca la disminución de

CRM1, como ha sido demostrado en células cancerosas (18). Como se reportó anteriormente (García Aguirre et al., 2019). De manera interesante, observamos que el tratamiento con selinexor disminuyó significativamente los niveles de CRM1 en los fibroblastos WT y HGPS después de 6 días de tratamiento (Figura 4C). Estos datos indican que el selinexor disminuye los niveles de CRM1 en los fibroblastos HGPS y restaura la localización nuclear de una proteína que contiene NES.

B



C

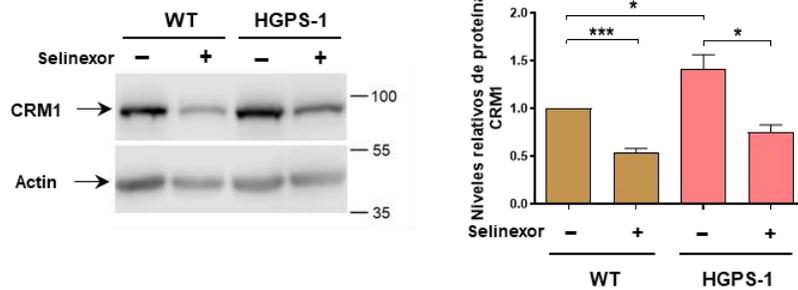


Figura 4. El tratamiento con Selinexor acumula en el núcleo a la ciclina B1 y disminuye el nivel de CRM1 en los fibroblastos WT y HGPS. (A) Los fibroblastos control (WT) y HGPS-1 y HGPS-2 se trataron durante 24 horas con 60 nM de Selinexor o con DMSO (vehículo). Las células se inmunomarcaron para la proteína ciclina B1 y se contratiñeron con DAPI para visualizar el núcleo. Se muestran imágenes representativas. Escala de barra, 10 μ M. La relación F n/c se calculó a partir de tres experimentos independientes (n = 300 células) y se obtuvieron diferencias significativas por la prueba U de Mann-Whitney (**** p <0.0001; *** p <0.001; ns, no significance). (B) Los lisados de las células WT y HGPS tratadas previamente por 6 días con Selinexor o el vehículo se analizaron mediante inmunodetección en fase sólida utilizando anticuerpo contra CRM1 y actina (control de carga). Se calcularon los niveles relativos de CRM1 de tres experimentos independientes y las diferencias significativas fueron obtenidas mediante la prueba no pareada t (**** p <0.0001; * p <0.05).

Adicionalmente, tomando en cuenta que Selinexor actúa como inductor de apoptosis en las células cancerosas (18), fue necesario descartar que este compuesto tenga tal efecto sobre los fibroblastos HGPS. Para abordar esta idea, las células HGPS-1 se trataron con Selinexor durante 6 días y posteriormente se evaluó la apoptosis mediante ensayos de anexina V. No se observó apoptosis significativa en las células HGPS-1 tratados con Selinexor, mientras que la incubación con el inductor de apoptosis estaurosporina (control positivo) dio como resultado un 50% de células apoptóticas en los cultivos control (WT), como lo muestran los análisis de citometría de flujo (Fig. 5). En resumen, Selinexor tiene la capacidad de inhibir el mecanismo de exportación nuclear de proteínas en las células HGPS inhibiendo farmacológicamente a CRM1 así como también induciendo su degradación, con efectos favorables sobre la fisiología celular y sin inducir apoptosis.

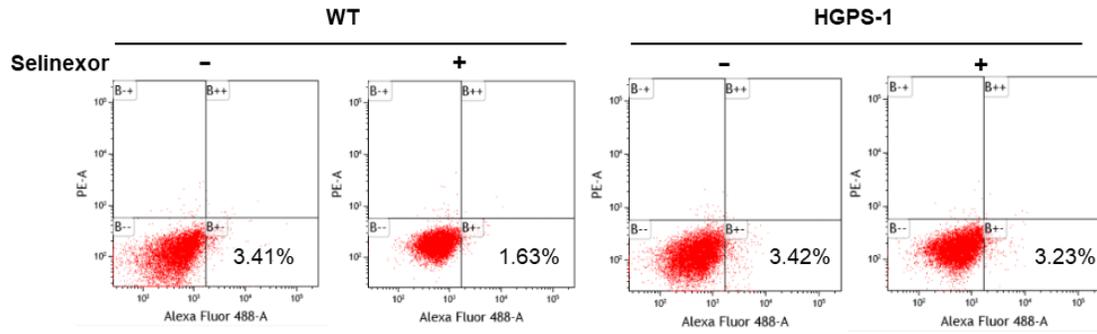
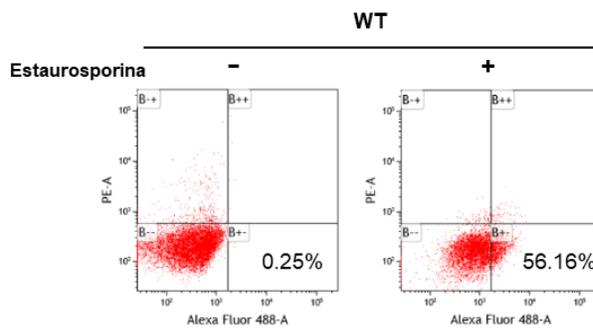
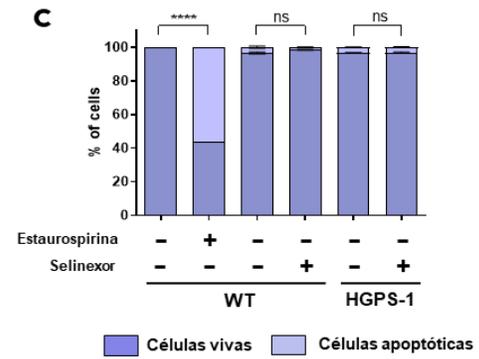
A**B****C**

Figura 5. El tratamiento con Selinexor no induce apoptosis en los fibroblastos HGPS. (A) Los fibroblastos WT se trataron durante 12 horas con estaurosporina 1 μm , un inductor de apoptosis o con el vehículo solamente y se analizaron mediante citometría de flujo para evaluar identificar células apoptóticas, como se describe en Métodos. Las células vivas están representadas en la sección B⁻ y las células apoptóticas en fase temprana están representadas en la sección B⁺. (B) Los fibroblastos WT y HGPS-1 se trataron durante 6 días con 60 nM de Selinexor o el vehículo (DMSO). Se muestran gráficas representativas de tres experimentos independientes. (C) El análisis cuantitativo de citómetro de flujo representa 30 000 eventos; se muestran las células vivas (barras de color púrpura oscuro) y las células apoptóticas (barras de color púrpura claro) de tres experimentos independientes. Las diferencias significativas de tres experimentos independientes se determinaron mediante la prueba t (**** $p < 0.0001$; ns, no significance).

La inhibición farmacológica de CRM1 mediada por selinexor rescata el fenotipo senescente de las células HGPS

Para evaluar el potencial terapéutico de Selinexor *in vitro*, se analizaron diferentes marcas de senescencia de las células HGPS-1/-2. Primeramente, se evaluó el impacto de Selinexor sobre la morfología nuclear mediante inmunodetección para la proteína lámina A/C. Se observaron núcleos con formas anormales, incluidos núcleos con ampollas, fisuras con forma de riñón y/o multilobulados, en la mayoría de las células HGPS-1 (95%) y HGPS-2 (90%) tratadas con vehículo (Fig. 6A y gráfica de la derecha). Por el contrario, consistentemente se encontraron núcleos con forma ovalada, como los de las células WT, en las células HGPS-1 (90%) y HGPS-2 (73%) tras el tratamiento con Selinexor (Fig. 6A). El análisis morfométrico de los núcleos utilizando parámetros de área y redondez nuclear validó la mejoría de la morfología nuclear de las células HGPS-1/-2 como respuesta a Selinexor (Fig. 6B).

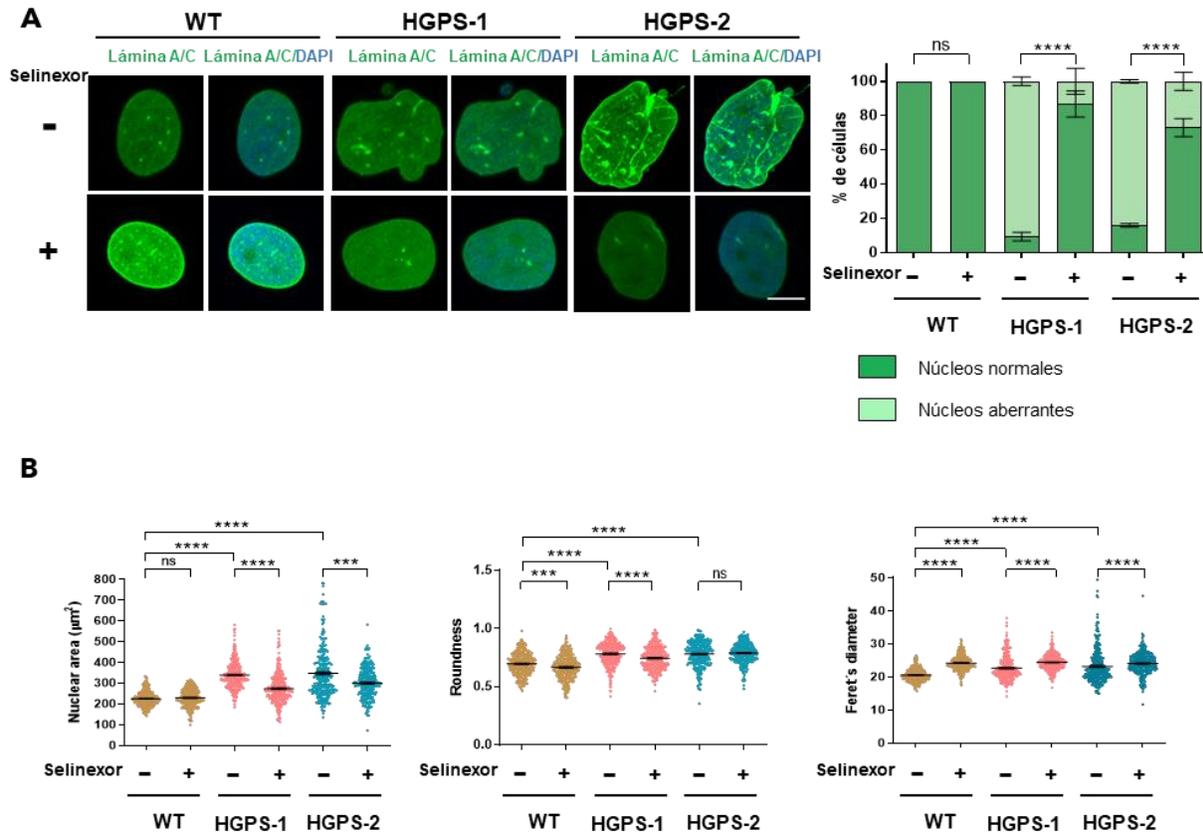


Figura 6. El tratamiento con selinexor es efectivo para aliviar las alteraciones nucleares de los fibroblastos HGPS. (A) Los fibroblastos WT y HGPS-1 y HGPS-2 se trataron durante 6 días con 60 nM de Selinexor o con el vehículo (DMSO). Las células se inmuno-marcaron con un anticuerpo para detectar lámina A/C y se seleccionaron imágenes representativas. Escala de barra, 10 μM . Panel derecho. Análisis cualitativo de los núcleos de las células tratadas. Las barras de color verde intenso representan los núcleos con morfología normal y las barras de color verde claro representan núcleos con alteraciones que incluyen invaginaciones, pliegues, etc. (B) Se llevo a cabo un análisis morfométrico de los núcleos y se calcularon los parámetros de área nuclear, redondez y diámetro de Feret con el software ImageJ. Los fibroblastos WT y HGPS-1 y HGPS-2 se trataron como se describió anteriormente. Las diferencias significativas se determinaron mediante la prueba U de Mann-Whitney ($n = 300$) a partir de tres experimentos independientes (**** $p < 0.0001$; *** $p < 0.001$; ns, no significancia).

A continuación, se analizó el impacto de Selinexor sobre la morfología celular senescente: los fibroblastos HGPS-1 y HGPS-2 se tiñeron con faloidina para visualizar el citoesqueleto de actina y medir el área celular. Como resultado del tratamiento con Selinexor, la forma típica aplanada y agrandada de los fibroblastos HGPS-1/2 cambió hacia una morfología fusiforme característica de los fibroblastos WT (Fig. 7A). La medición del área celular confirmó una disminución significativa en el tamaño de los fibroblastos HGPS-1/HGPS-2 tratados con Selinexor, en comparación con sus homólogos tratados con vehículo (Fig. 7B).

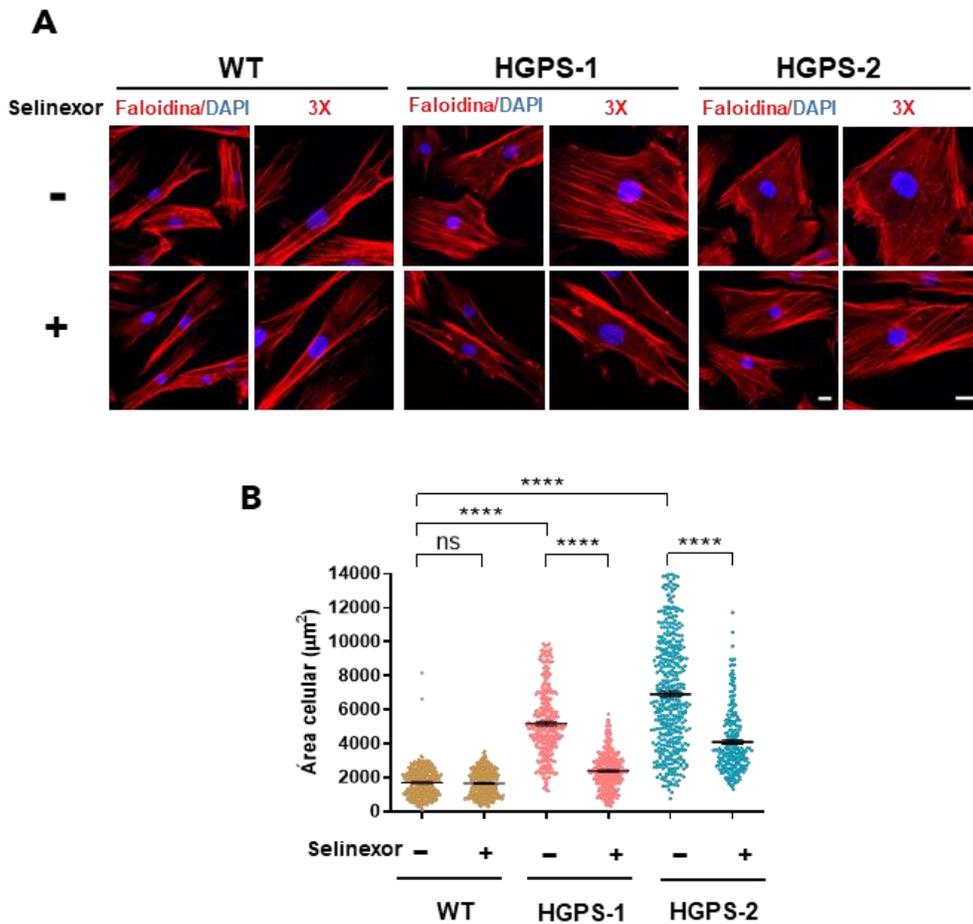


Figura 7. La inhibición de CRM1 mediada por selinexor previene la morfología senescente en los fibroblastos HGPS. Los fibroblastos WT y HGPS-1 y HGPS-2 se trataron durante 6 días con Selinexor 60 nM o con el vehículo (DMSO). (A) Las células se marcaron con faloidina para visualizar el citoesqueleto de actina y se muestran imágenes representativas. Escala de barra, 10 μ m. (B) El área celular se estimó a partir de tres experimentos independientes (n = 300 células) y se obtuvieron diferencias significativas mediante la prueba U de Mann-Whitney independientes (**** p <0.0001; ns, no significance).

El Selinexor también fue eficaz para prevenir la formación de nucléolos agrandados, una característica bien reconocida de las células senescentes (19-20). Se encontró consistentemente un solo nucléolo o dos nucléolos prominentes en las células HGPS-1/-2 inmunomarcadas previamente para la proteína nucleolar B23, mientras que el tratamiento con Selinexor resultó en nucléolos más pequeños y en un mayor número por célula, como lo que se observa en las células WT (Fig. 8A). La medición del área nucleolar confirmó estas observaciones (Fig. 8B).

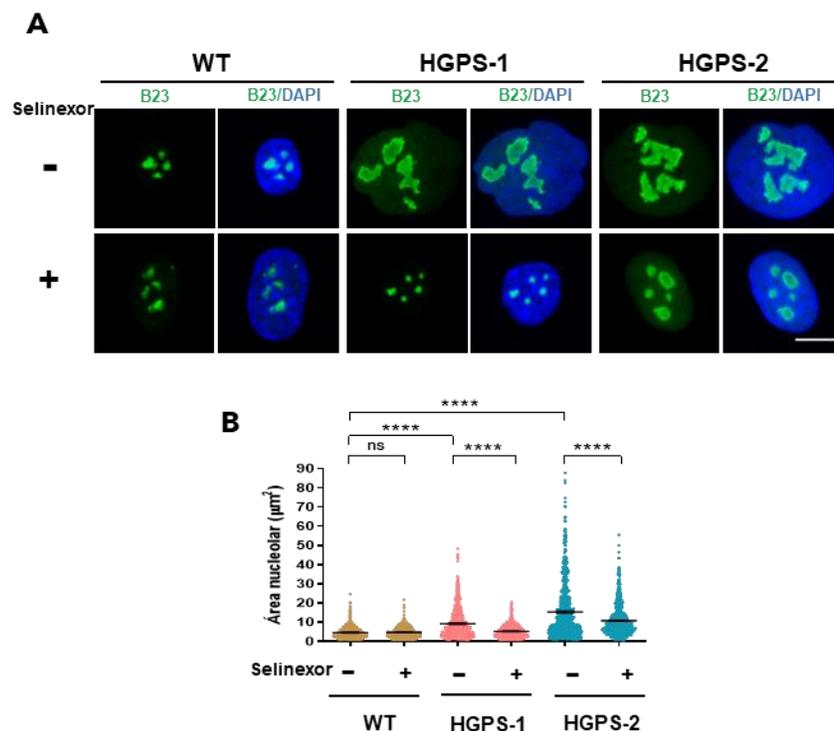


Figura 8. La inhibición de CRM1 mediada por selinexor rescata la morfología nucleolar de los fibroblastos HGPS. Los fibroblastos WT y HGPS-1 y HGPS-2 se trataron durante 3 días con 60 nM de Selinexor o con el vehículo (DMSO). (A) Las células se inmunomarcaron para B23 para visualizar los nucléolos y se seleccionaron imágenes de microscopía confocal representativas. Escala de barra, 10 μ m. (B) El área nucleolar se determinó a partir de tres experimentos independientes (n = 600 nucléolos por condición) mediante el programa ImageJ y las diferencias significativas se determinaron mediante la prueba U de Mann-Whitney independientes (**** p <0.0001; ns, no significancia).

Finalmente, se observó una recuperación sustancial de la heterocromatina periférica en ambos cultivos de células HGPS después del tratamiento con Selinexor, como lo demuestra el análisis y la cuantificación de la inmunotinción del marcador de heterocromatina H3K9me3 (Fig. 9A y 9B).

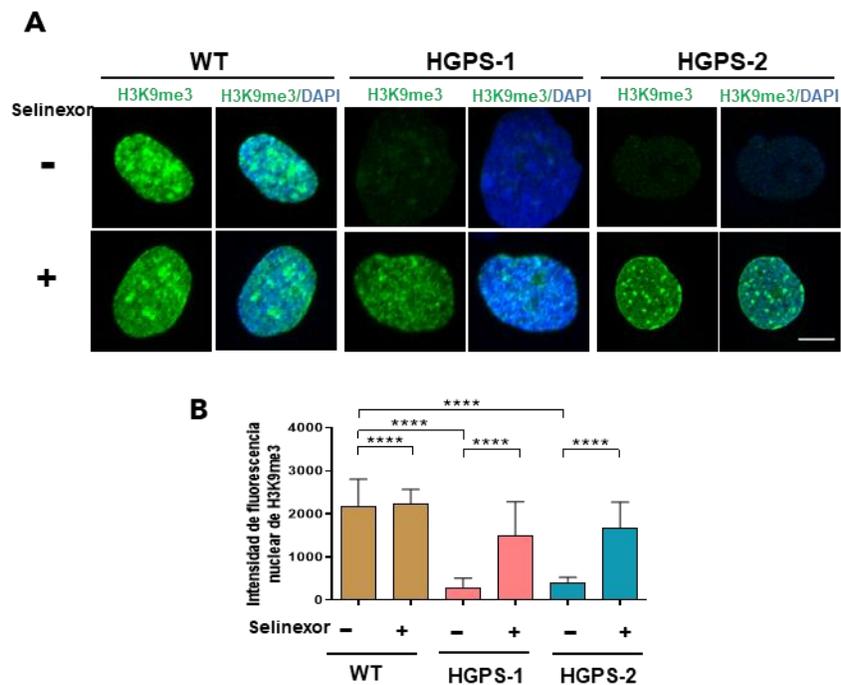


Figura 9. La inhibición de CRM1 mediada por selinexor recupera la heterocromatina perinuclear en los fibroblastos HGPS. Los fibroblastos WT y HGPS-1 y HGPS-2 se trataron durante 6 días con 60 nM de Selinexor o con el vehículo (DMSO). (A) Las células se inmunomarcaron para H3K9me3 para visualizar la heterocromatina y se seleccionaron imágenes representativas. Escala de barra, 10 μ M. (B) La fluorescencia nuclear se determinó mediante el programa ImageJ a partir de tres experimentos independientes (n = 300 células por condición experimental). Las diferencias significativas se determinaron mediante la prueba U de Mann-Whitney independientes (**** $p < 0.0001$).

Las células senescentes dejan de dividirse y permanecen detenidas irreversiblemente en la fase G1 del ciclo celular para evitar la duplicación de genomas dañados (21), Por lo tanto, intentamos determinar si el alivio del fenotipo senescente de las células HGPS mediado por Selinexor se refleja en su perfil del ciclo celular. Como supusimos, encontramos que la mayoría de las células HGPS-1/HGPS-2 están detenidas en G0/G1 (~90%), con pocas células (5-10%) en las fases S y M (Fig. 10A). Interesantemente, tras el tratamiento con Selinexor se obtuvo una reducción notable en el porcentaje de células HGPS-1/HGPS-2 en la fase G1 (25-30%), con un aumento concomitante de células en las fases S (10-30%) y M (10-15%), como lo muestra la citometría de flujo (Fig. 10A). Para confirmar el efecto de Selinexor sobre la progresión del ciclo celular a nivel bioquímico, se analizaron los inhibidores de cinasas dependientes de ciclina p16 y p21WAF1/CIP1. Las células HGPS-1/HGPS-2 mostraron niveles elevados de las proteínas p16 y p21WAF1/CIP1, pero después de la incubación de estos cultivos celulares con Selinexor se observó una clara disminución en los niveles de ambas proteínas (Fig. 10B- C).

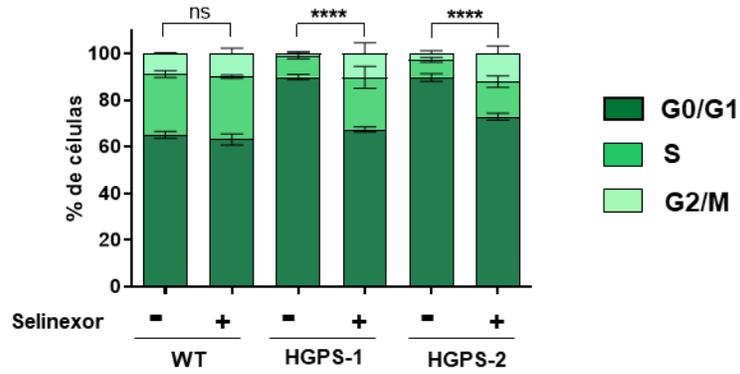
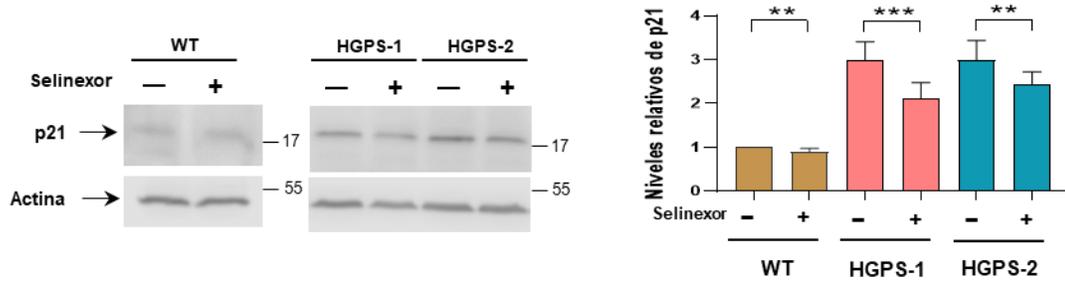
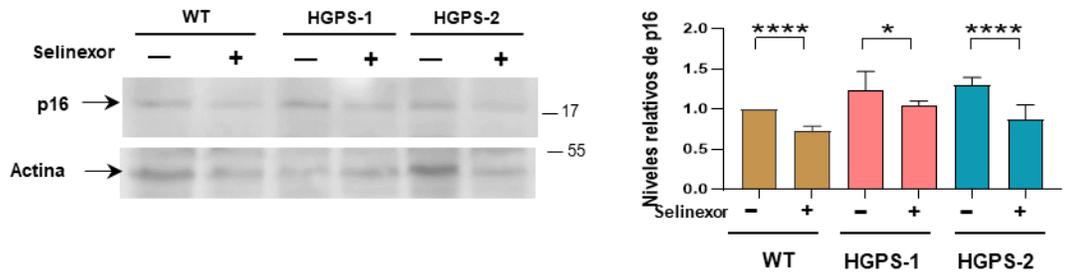
A**B****C**

Figura 10. El tratamiento con Selinexor previene que los fibroblastos HGPS entren a senescencia celular disminuyendo los niveles de las proteínas p16 y p21. (A) Los fibroblastos WT y HGPS1 y HGPS2 se trataron durante 6 días con 60 nM de Selinexor o con el vehículo (DMSO), y posteriormente se analizaron mediante citometría de flujo como se describe en Métodos. El perfil del ciclo celular se representa cuantitativamente. Las células en las fases G0/G1 corresponden a las barras con color verde intenso; las células en la fase S corresponden a las barras color verde, mientras que las células en G2/M se representan con las barras de color verde claro. Las diferencias significativas de tres experimentos independientes se determinaron mediante la prueba t independientes (**** $p < 0.0001$; ns, no significance). (B) y (C) Los fibroblastos WT y HGPS1 se trataron durante 6 días con 60 nM de Selinexor o con el vehículo (DMSO). Enseguida los lisados de las células tratadas se analizaron mediante inmunodetección en fase sólida, utilizando anticuerpos contra p16, p21 y β -actina (control de carga). En las gráficas de la derecha se muestran los niveles relativos de p16 y p21 obtenidos a partir de tres experimentos independientes, y las diferencias significativas se obtuvieron mediante la prueba t student independientes (* $p < 0.1$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).

Inesperadamente, se observó un mayor porcentaje de fibroblastos HGPS-1 teñidos para la enzima β -galactosidasa asociada a la senescencia celular (SA- β gal) después del tratamiento con Selinexor (Fig. 11A y B), en comparación con las células HGPS tratadas con el vehículo solamente. Tomando en consideración que el factor de transcripción EB (TFEB) es un regulador maestro de la función lisosomal (22) y al mismo tiempo es cliente de CRM1 (23), es probable que el aumento de la actividad de SA- β gal encontrada en los cultivos de HGPS tratados con Selinexor sea el resultado de una mayor actividad lisosomal promovida por la acumulación nuclear de TFEB y que no corresponda necesariamente a la presencia de un mayor número de células senescentes. En conjunto, nuestros resultados implican que la normalización de la actividad de CRM1 mediante el tratamiento con Selinexor impidió la entrada de fibroblastos HGPS a la senescencia y, en consecuencia, mejoró su fisiología.

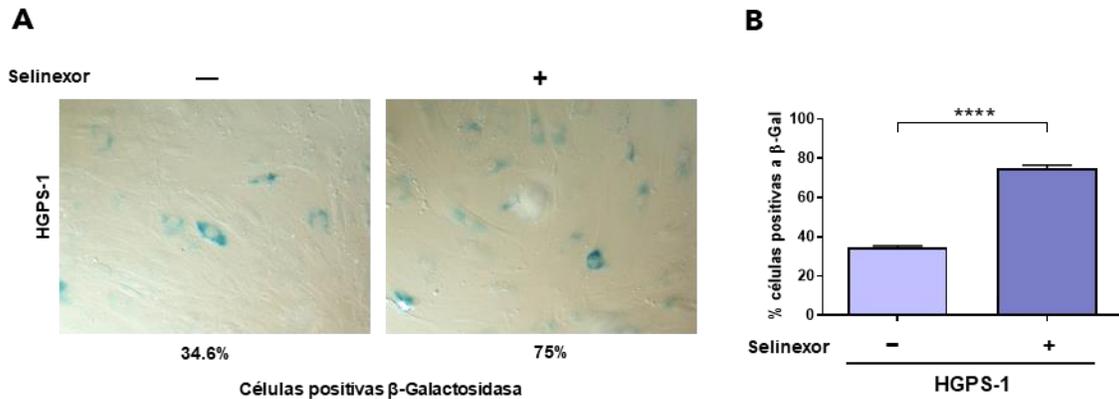


Figura 11. El tratamiento con Selinexor incrementó los niveles de células positivas a la tinción para la enzima β -galactosidasa asociada a senescencia en los fibroblastos HGPS. (A) Los fibroblastos HGPS-1 se trataron durante 6 días con 60 nM de Selinexor o con el vehículo (DMSO) se tiñeron para la actividad de β -galactosidasa, como se describe en Métodos y las células se analizaron mediante microcopia de campo claro. Se muestran imágenes representativas de 3 experimentos independientes (n=300 células por condición). (B) La actividad de β -galactosidasa se graficó para cada condición experimental independientes (**** p <0.0001).

La inhibición de CRM1 mediada por Selinexor disminuye los niveles de progerina en los fibroblastos HGPS.

Se conoce que los fármacos que activan autofagia promueven la eliminación de progerina (24-26), por lo que considerando que Selinexor es considerado un inductor de autofagia (27), nos preguntamos si este compuesto influye sobre los niveles de progerina. De manera interesante, el tratamiento con Selinexor durante 6 días resultó en una disminución significativa (~50%) de los niveles de progerina en los cultivos HGPS-1 y HGPS-2, como lo demuestran los ensayos de inmunodetección en fase sólida (Fig. 12A). En apoyo a estos resultados, el tratamiento con Selinexor por 6 días resultó en una disminución significativa de la intensidad nuclear de progerina en ambos cultivos HGPS y la desaparición concomitante de las aberraciones de la envoltura nuclear, en comparación con los mismos cultivos tratados con el vehículo solamente (Fig. 12B).

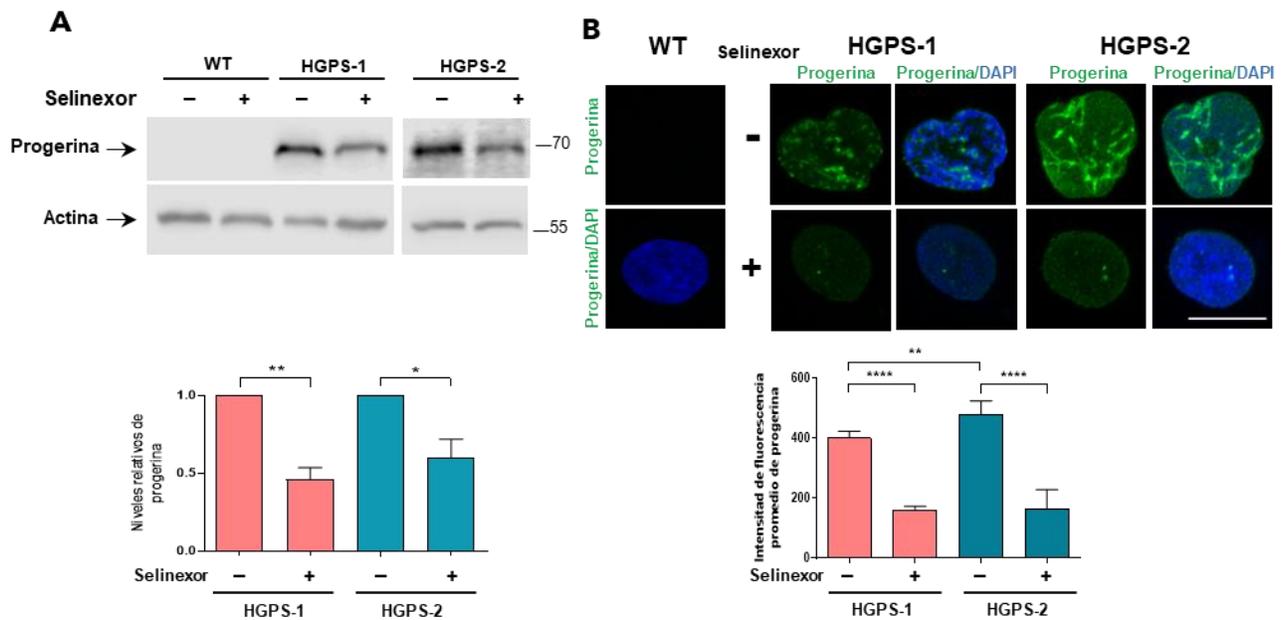


Figura 12. La inhibición de CRM1 mediada por Selinexor reduce los niveles de progerina en los fibroblastos HGPS. (A) Los lisados de las células WT y HGPS-1 y HGPS-2 tratadas durante 6 días con Selinexor o con el vehículo se analizaron mediante inmunodetección en fase sólida utilizando anticuerpos contra progerina y actina (control de carga). Se calcularon los niveles de progerina a partir de tres experimentos independientes y las diferencias significativas se obtuvieron mediante la prueba t student. (B) Los fibroblastos WT y HGPS-1 y HGPS-2 se trataron durante 6 días con 60 nM de Selinexor o con el vehículo (DMSO) Enseguida, las células se inmunomarcaron para progerina y se analizaron mediante microscopia confocal. Se muestran imágenes representativas de tres experimentos independientes. Escala de la barra, 10 μ M. Se calculó la intensidad de la fluorescencia nuclear de progerina mediante el programa ImageJ (n = 300 células de tres experimentos independientes) y las diferencias significativas se determinaron mediante la prueba U de Mann-Whitney (* p <0.1; ** p <0.01; **** p <0.0001).

Con la finalidad de averiguar si la disminución de progerina como respuesta al tratamiento con Selinexor es un evento temprano, investigamos mediante ensayos de inmunofluorescencia la dinámica de la pérdida de fluorescencia de progerina en las células HGPS tratadas con Selinexor por diferentes tiempos (6, 12,

24 horas y 2, 3 y 6 días). Se observó una disminución en la intensidad de la fluorescencia de progerina desde las 6 horas de tratamiento y la señal prácticamente desapareció después de 3 días de tratamiento. Por lo que respecta a las aberraciones nucleares, estas también disminuyeron notablemente, pero hasta los 3 días de tratamiento con Selinexor (Fig. 13). En conjunto, estos datos indican que Selinexor, es capaz de disminuir los niveles de progerina desde tiempos tempranos del tratamiento de las células HGPS.

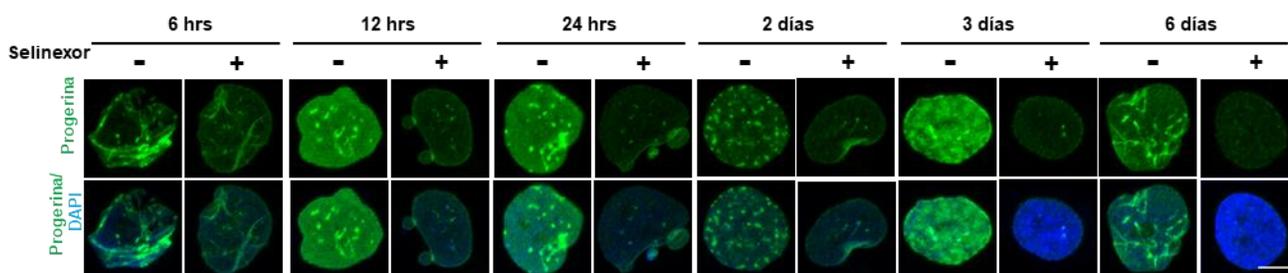


Figura 13. Efecto de Selinexor sobre la progerina a través del tiempo. Los fibroblastos HGPS-1 se trataron durante 6, 12, 24 horas y 2, 3 y 6 días con 60 nM de Selinexor o con el vehículo (DMSO). Las células se inmunomarcaron para progerina y se analizaron mediante microscopia confocal. Se muestran imágenes representativas de tres experimentos independientes. Escala, 10 μ M.

Con el fin de averiguar si el efecto del Selinexor sobre progerina es específico o afecta también el nivel de las láminas A/C, utilizamos un anticuerpo que detecta a estas tres proteínas para los ensayos de inmunodetección en fase sólida. No observamos diferencias significativas de las láminas A/C en las células HGPS-1 después del tratamiento con Selinexor por 6 días, pero si reproducimos la disminución de progerina (Fig. 14), Estos resultados sugieren que Selinexor ejerce un efecto negativo sobre progerina, muy probablemente a través de la inducción de autofagia.

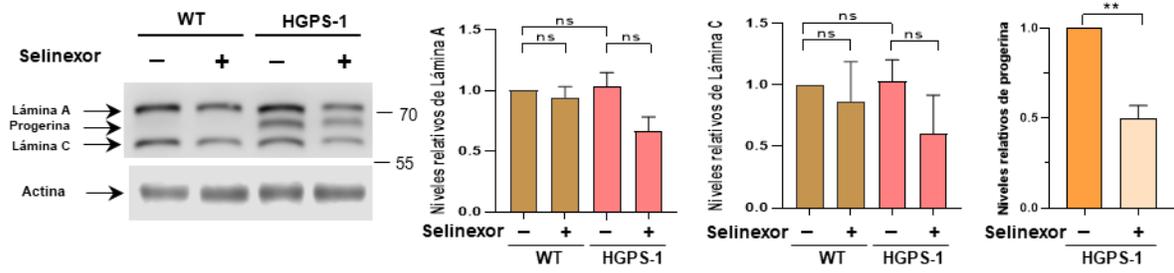


Figura 14. El tratamiento con Selinexor no afectó los niveles de las láminas A y C en los fibroblastos HGPS-1. Los fibroblastos HGPS-1 se trataron durante 6 días con 60 nM de Selinexor o con el vehículo (DMSO). Los lisados se analizaron mediante inmunodetección en fase sólida utilizando anticuerpos contra lámina A/C/progerina y actina (control de carga). Se muestran los niveles relativos de progerina, lámina A y lámina C. Las diferencias significativas se determinaron a partir de 3 experimentos independientes usando la prueba t (** $p < 0.01$; ns: no significancia).

Con el fin de establecer si el tratamiento con LMB afecta también el nivel de progerina, decidimos tratar las células HGPS-1 con dos concentraciones distintas del fármaco; una concentración por debajo de su IC_{50} (0.15 nM) y una segunda concentración por arriba del IC_{50} (50 nM). Interesantemente, no observamos efecto alguno sobre la intensidad de fluorescencia de la progerina ni sobre las aberraciones nucleares presentes en las células HGPS-1 con ninguna de las dos concentraciones de LMB (Fig. 13A). De manera similar, el nivel de progerina evaluado por inmunodetección en fase sólida, se mantuvo inalterado en los fibroblastos HGPS-1 después del tratamiento con cualquiera de las dos concentraciones de LMB (Fig. 13B). En conjunto, estos resultados indican que, no obstante que tanto Selinexor como LMB son inhibidores específicos de CRM1, solo el primero es efectivo para disminuir los niveles de progerina.

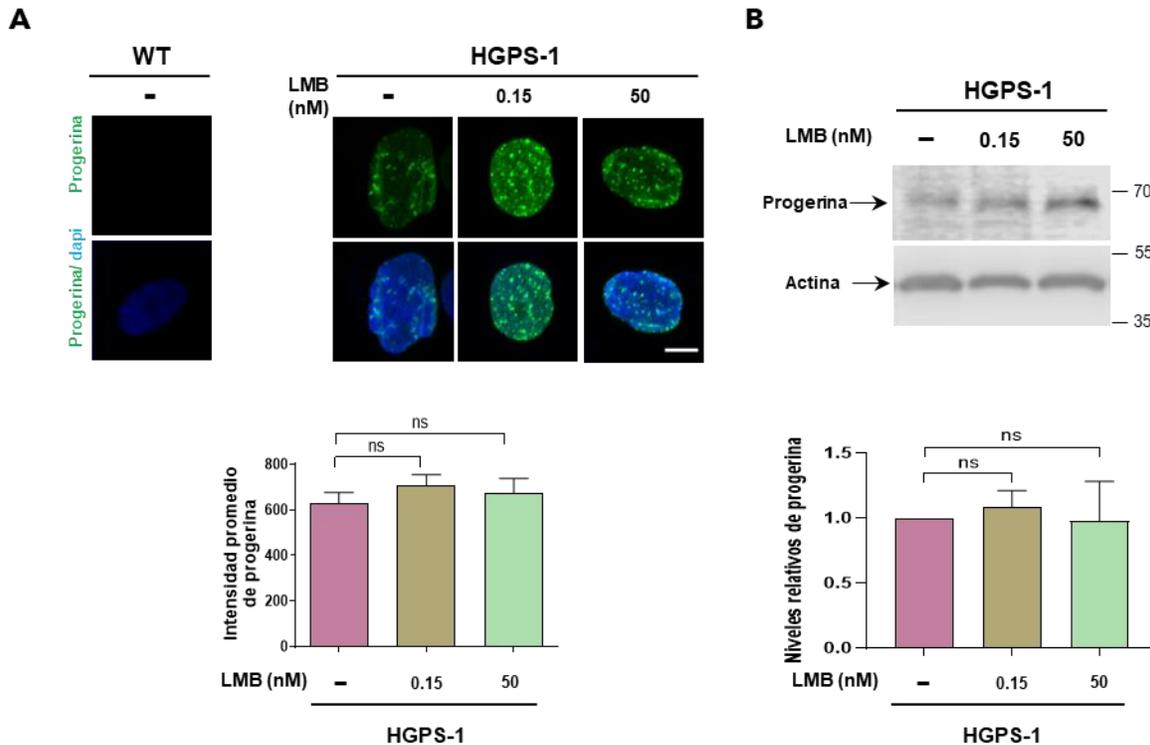


Figura 15. El tratamiento de los fibroblastos HGPS-1 con LMB no afecto la progerina (A) Los fibroblastos WT y HGPS-1 se trataron durante 6 días con 0.15 nM o 50 nM de LMB, o con el vehículo solamente (EtOH). En seguida, las células se inmunomarcaron para la progerina y se evaluaron por microscopia confocal. Se muestran imágenes representativas (escala de la barra, 10 μ M). Panel derecho. La intensidad de la fluorescencia generada por el anticuerpo anti-progerina se calculó por ImageJ (n = 300 células por condición experimental y de tres experimentos independientes). Las diferencias significativas se determinaron mediante la prueba U de Mann-Whitney (Abajo). (B) Las células WT y HGPS-1 se trataron durante 6 días con 0.15 nM o 50 nM de LMB, o con el vehículo solamente (EtOH). En seguida, se obtuvieron los lisados y se analizaron mediante Western Blot utilizando anticuerpos contra progerina y actina (control de carga). Se muestran los niveles relativos de progerina obtenidos de tres experimentos independientes (ns, no significativo).

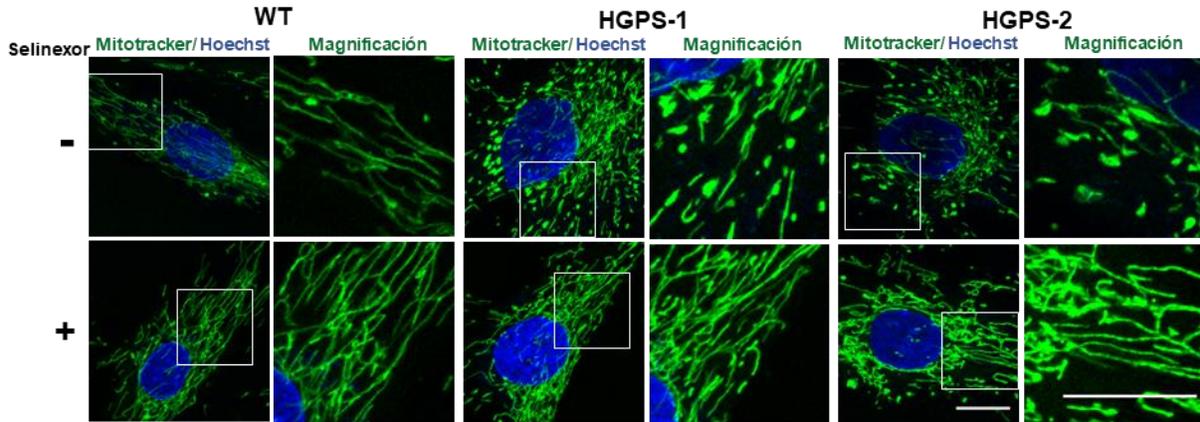
La modulación farmacológica de CRM1 mediante Selinexor reestablece la morfología mitocondrial y disminuye los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los fibroblastos HGPS

Estudios previos han demostrado que la presencia de progerina provoca disfunción mitocondrial, lo que consecuentemente origina acumulación de proteínas oxidadas y generación de ROS (Viteri et al., 2010). Interesantemente, nuestro grupo de trabajo demostró recientemente que la LMB reestablece la morfología mitocondrial de los fibroblastos HGPS (Monterrubio-Ledezma et al., 2023). Por lo tanto, nos preguntamos si la modulación farmacológica de la actividad de CRM1 mediante tratamiento con Selinexor, ayuda a recuperar la morfología mitocondrial de los fibroblastos HGPS-1 y HGPS-2. Para lo cual, evaluamos la morfología mitocondrial de los cultivos WT, HGPS-1 Y HGPS-2, los cuales se sincronizaron en la fase G0/G1 previo al tratamiento con Selinexor o con el vehículo solamente (control). Debido a que los fibroblastos muestran una morfología mitocondrial ramificada en esta fase del ciclo celular (Arciuch et al., 2012). La sincronización de los cultivos se realizó bajando la concentración de suero al 0.1% por 2 días o por 24 horas antes de terminar el tratamiento con Selinexor. Posteriormente, las células se crecieron en medio con suero al 10% para analizar la morfología de las mitocondrias mediante su tinción con el colorante vital Mitotracker.

Se observó que la morfología mitocondrial predominante de los cultivos WT se caracteriza por una forma alargada y ramificada que da como resultado un patrón reticular. Esta morfología es compatible con mitocondrias que poseen capacidades respiratorias y energéticas normales. En los fibroblastos HGPS-1 y HGPS-2 tratados con el vehículo se observó un número importante de mitocondrias fragmentadas e hinchadas que nos indican que están dañadas. De manera interesante, después del tratamiento de ambos cultivos de fibroblastos HGPS con Selinexor se observó la recuperación de la morfología mitocondrial alargada que forma ramificaciones y un patrón reticular (Fig. 12A), lo que sugiere que se restableció la funcionalidad mitocondrial como respuesta al Selinexor. El análisis morfométrico de las mitocondrias, calculando el área mitocondrial y la circularidad de este organelo, así como el diámetro de Feret (distancia más larga entre dos

puntos de un cuerpo cilíndrico), (Fig. 12B), confirmó que el tratamiento con Selinexor restablece la morfometría típica de las mitocondrias de los cultivos WT (Fig. 12B).

A



B

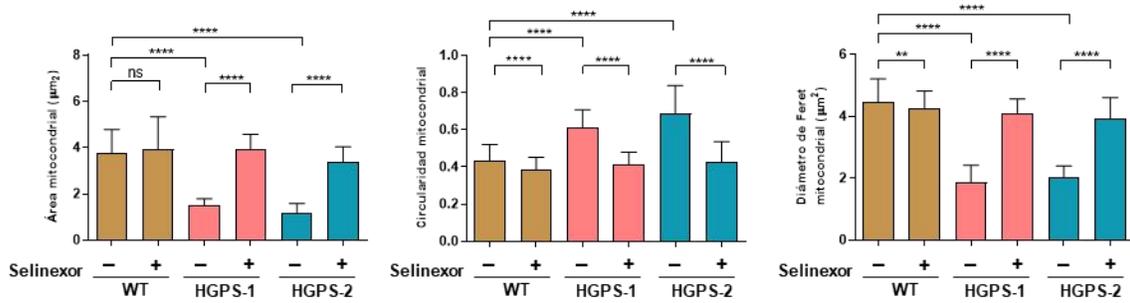


Figura 16. El tratamiento con Selinexor alivió la morfología mitocondrial aberrante de los fibroblastos HGPS. Los fibroblastos WT, HGPS-1 y HGPS-2 se trataron durante 3 días con 60 nM de Selinexor o con el vehículo solamente (DMSO). (A) Se muestran imágenes de fluorescencia representativas de mitocondrias teñidas con MitoTracker (color verde). Escala de la barra, 10 μ M. (B) Se llevo a cabo un análisis morfométrico de las mitocondrias mediante el cálculo de los parámetros de área mitocondrial, circularidad y diámetro de Feret, utilizando el software ImageJ (n = 150 células por condición experimental). Las diferencias significativas se determinaron mediante la prueba U de Mann-Whitney (** p <0.01; **** p <0.0001; ns: no significancia).

Después nos preguntamos si el efecto benéfico de Selinexor sobre la morfología mitocondrial de los fibroblastos HGPS también se refleja en una reducción de los niveles de ROS, como se demostró que lo hace el tratamiento con LMB (Monterrubio-Ledezma et al., 2023). Evaluamos la generación de ROS intracelulares a través de microscopía confocal utilizando un colorante fluorescente y permeable a las células que se modifica y florece ante la presencia de ROS. Este colorante denominado H2DCFDA permite visualizar las células que producen ROS por microscopía confocal. En primer lugar, tratamos los fibroblastos WT con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para generar ROS artificialmente y probar la eficacia para detectar ROS intracelulares del colorante H2DCFDA. De acuerdo con lo esperado, las células incubadas con peróxido de oxígeno generaron fluorescencia mientras que las células tratadas con vehículo no mostraron fluorescencia (Fig. 14A). Enseguida, los fibroblastos WT, HGPS-1 y HGPS-2 se trataron durante 3 días con Selinexor o con el vehículo solamente, y transcurrido el tiempo se tiñeron con el colorante H2DCFDA, como se describe en los Métodos. Observamos una alta intensidad de fluorescencia en los cultivos HGPS-1 y HGPS-2 tratados con el vehículo, lo que indica la producción intracelular de ROS (Fig. 14B). De manera interesante, los fibroblastos HGPS-1 y HGPS-2 tratados con Selinexor durante 3 días, disminuyeron drásticamente la intensidad de fluorescencia generada por el colorante H2DCFDA, incluso, en una cantidad significativa de estas células no fue perceptible la fluorescencia (Fig. 14B).

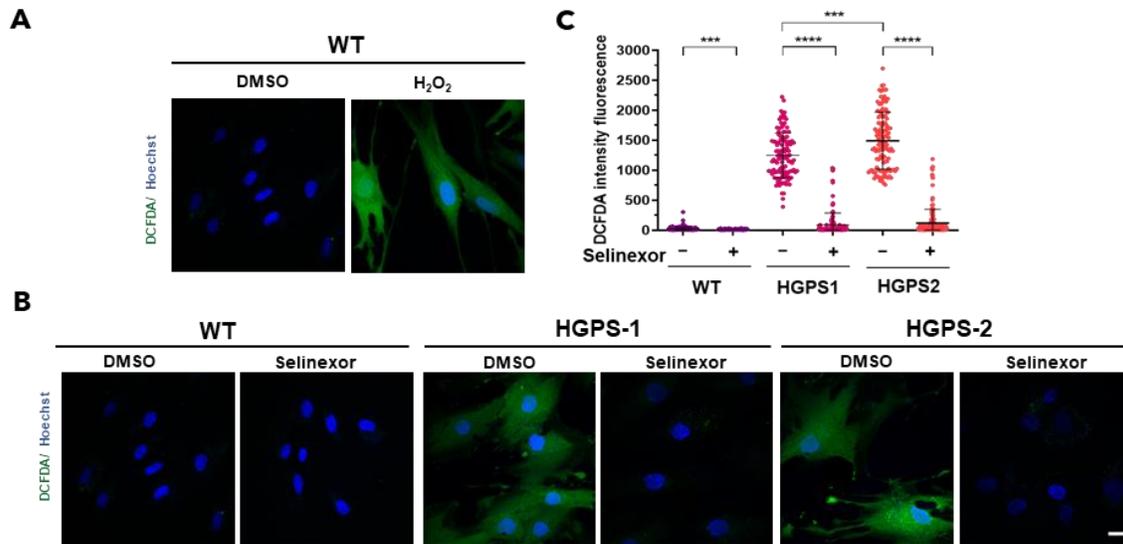


Figura 17. El tratamiento con Selinexor disminuyó la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelulares en los fibroblastos HGPS. (A) Las células WT sembradas sobre cubreobjetos se incubaron con H₂O₂ o con el vehículo solamente (DMSO). Para detectar la generación de ROS intracelulares se empleó el colorante H₂DCFDA, el cual emite fluorescencia en presencia de ROS, y un análisis posterior por microscopía confocal (ver los Métodos). Los núcleos se tiñeron con Hoechst. (B) Los fibroblastos WT, HGPS-1 y HGPS-2 se trataron durante 3 días con 60 nM de Selinexor o con el vehículo (DMSO) solamente, y enseguida se incubaron con H₂DCFDA. Se muestran imágenes representativas de las células teñidas con H₂DCFDA y Hoechst. Barra de escala, 10 μM. (C) La intensidad de fluorescencia intracelular de los tres grupos experimentales se midió mediante el programa ImageJ. La grafica muestra los resultados de tres experimentos independientes (n = 150 células por condición). Las diferencias significativas se determinaron usando la prueba U de Mann-Whitney (6****p*<0.001; *****p*<0.0001).

DISCUSIÓN

La alteración del tráfico nucleocitoplasmático de proteínas es un determinante de diferentes enfermedades relacionadas con el envejecimiento, incluido el cáncer (Stelma et al., 2016), la neurodegeneración (Girdhar & Guo, 2022) y el envejecimiento prematuro (Kumar & Lapierre, 2021; Martins et al., 2020; Park et al., 2021). Previamente, en nuestro grupo de trabajo, demostramos que los fibroblastos

primarios de pacientes con HGPS presentan una acelerada exportación de proteínas nucleares, la cual es causada por la sobreexpresión de CRM1, exportina que dirige este proceso celular; y que esta alteración está relacionada con el fenotipo senescente de estas células (García-Aguirre et al., 2019). Demostramos también que el bloqueo farmacológico de CRM1 utilizando LMB mitiga las marcas senescentes de los fibroblastos de HGPS; así mismo revelamos que si se fuerza la sobreexpresión de CRM1 se induce senescencia en fibroblastos normales (García-Aguirre et al., 2019). Por lo tanto, consideramos relevante determinar si la modulación farmacológica de CRM1 podría ser una estrategia terapéutica viable contra HGPS. No obstante, para abordar este objetivo es necesario utilizar un inhibidor específico de CRM1 con propiedades farmacológicas superiores a las de LMB, ya que ese último fármaco mostró toxicidad *in vivo* (Newlands et al., 1996.).

En este estudio, demostramos que el tratamiento de fibroblastos HGPS con selinexor, un inhibidor selectivo de CRM1 desarrollado por Karyopharm Therapeutics (Ishizawa et al., 2015), (Gravina et al., 2015; Landes et al., 2023) rescata la senescencia de los fibroblastos HGPS; como se demostró mediante la mitigación de la morfología nuclear aberrante, la morfología celular senescente, la morfología aberrante de la mitocondria y la expansión nucleolar, así como la recuperación de la heterocromatina y la disminución de los niveles de ROS. Adicionalmente, demostramos que el selinexor presenta una menor toxicidad que LMB, según lo determinado por sus respectivos valores de IC50. El selinexor actúa uniéndose selectivamente al residuo Cys 528 de CRM1, inhibiendo así la unión de CRM1 con la NES de las proteínas cargo (Ishizawa et al., 2015). Por lo que respecta a las evidencias bioquímicas del efecto anti-senescente del selinexor, se observó una disminución de los niveles de p16INK4A y p21CIP/WAF1 y un decremento en el porcentaje de células en la fase G0/G1 del ciclo celular. Inesperadamente, el tratamiento con selinexor pero no con LMB indujo la degradación de progerina en los fibroblastos HGPS.

La disfunción de la exportación nuclear debido al aumento de la expresión/actividad de CRM1 es una característica que se presenta tanto en HGPS

como en diferentes tipos de cáncer (Capell et al., 2007; García-Aguirre et al., 2019); sin embargo, la inhibición farmacológica de CRM1 mediada por selinexor tiene diferentes consecuencias fisiológicas en cada sistema celular. En las células cancerosas, el tratamiento con selinexor provoca la acumulación nuclear y por lo tanto una mayor actividad de factores supresores de tumores, tales como las proteínas p21CIP/WAF1, p27KIP1, p53, p73, BRCA 1/2, RB y FOXO (Mahipal & Malafa, 2016). Además, selinexor conduce al secuestro nuclear de complejos de ARNm del oncogén eIF4E, lo que resulta en una disminución de la traducción de los oncogenes MYC, BCL2 y BCL6 (Cisneros & García-Aguirre, 2020). En conjunto, estos eventos culminan en la apoptosis de las células cancerosas, mientras que las células normales no se ven afectadas (Gravina et al., 2015; Mahipal & Malafa, 2016). Debido a la actividad antitumoral que exhibe el selinexor, actualmente se emplea en un número alto de ensayos clínicos, incluidos sarcomas, gliomas, leucemias, cáncer gástrico, melanoma y cáncer colorrectal (Gravina et al., 2015). Por el contrario, el tratamiento con selinexor rescata el fenotipo senescente de las células HGPS sin inducir apoptosis. Es probable que la acumulación nuclear de proteínas que contienen NES en los fibroblastos HGPS tratados con selinexor, contrarreste de alguna manera la senescencia celular (García-Aguirre et al., 2019). Entre las proteínas cargo de CRM1 que podrían atenuar la senescencia se encuentran Sirtuin 2, involucrada en la organización de la heterocromatina; B23, implicado en la estructura y función de los nucléolos; distrofina Dp71 y β distroglicano, implicados en la arquitectura nuclear; la telomerasa, esencial para la homeostasis de los telómeros; y p53, proteína fundamental para la progresión del ciclo celular y la senescencia replicativa (Cisneros & García-Aguirre, 2020). A este respecto, un artículo reciente demostró que la proteína EP300, una lisina acetiltransferasa implicada en la regulación de la vía mTORC1/autofagia, está deslocalizada en el citoplasma de los fibroblastos HGPS, debido a la hiperactividad de CRM1. De manera interesante, la normalización de la localización nuclear del EP300 dio como resultado la mitigación de la senescencia de las células HGPS (Son et al., 2024). Con la finalidad de precisar qué conjunto de proteínas que

responden al selinexor dirigen mayoritariamente su acción anti-senescente, se requiere llevar a cabo un análisis proteómico posterior.

En nuestro grupo de trabajo se llevó a cabo un análisis transcripcional del efecto de selinexor sobre la senescencia celular en los fibroblastos HGPS, y se encontró que el tratamiento con este compuesto normalizó la expresión de numerosos genes que estaban anormalmente sobre-expresados, los cuales están implicados en la regulación del ciclo celular, la inflamación, la función ribosomal, la autofagia y la reparación del ADN (Soto-Ponce; et al; artículo en proceso de publicación). Consistentemente con nuestros resultados, el silenciamiento de la expresión de CRM1 extendió la longevidad del nematodo *C. elegans* (Buchwalter & Hetzer, 2017; Silvestrini et al., 2018). En este organismo, el bloqueo genético o farmacológico de CRM1 conduce a la acumulación de numerosas proteínas en el núcleo y en consecuencia, a la inducción de autofagia, lo que a su vez reduce la síntesis de proteínas y alivia la expansión nucleolar, mediante la regulación negativa de RPL-11 (proteína ribosomal) y fibrilarina (proteína nucleolar), respectivamente. Estos autores proponen que la atenuación de la actividad de CRM1 mejoró la proteostasis y prolongó la vida del nematodo a través de una combinación de diferentes mecanismos, el recambio de proteínas mediado por la autofagia, la dinámica de los ribosomas y la traducción de proteínas (Silvestrini et al., 2018).

Además de concentrar proteínas clave en el núcleo, selinexor promueve la eliminación de progerina, lo que evita los efectos tóxicos ejercidos por la proteína mutante. En este sentido, previamente se han identificado compuestos con capacidad para inducir la degradación de la progeria mediante la activación de la autofagia, entre ellos la rapamicina (inhibidor de la vía mTOR) (23), MG132 (inhibidor del proteasoma) (22), sulforafano (compuesto antioxidante) (45). y el neuropéptido Y (46). La elucidación del mecanismo por el cual el selinexor disminuye los niveles de progerina fue también abordado por nuestro laboratorio, y encontramos que el selinexor induce la degradación de progerina activando la autofagia, sin un efecto aparente sobre su ARNm correspondiente (Soto-Ponce; et

al; artículo en proceso de publicación). Por lo tanto, la acción antisenescencia sobre el HGPS se produce a través de al menos dos mecanismos distintos: a) restauración del equilibrio nucleocitoplasmático de las proteínas al atenuar la actividad de CRM1 y b) reducción de la acción perjudicial de la progerina al promover su eliminación por autofagia. En futuras investigaciones proponemos analizar la contribución separada de estos dos mecanismos para la acción gero-protectora del selinexor.

En resumen, demostramos que la inhibición farmacológica de CRM1 usando selinexor es una estrategia factible para tratar HGPS y demostramos que la actividad antisenescente de selinexor se ejerce recuperando la partición nucleocitoplasmática normal de las proteínas e induciendo la eliminación de progerina en los fibroblastos de HGPS.

CONCLUSIONES

1. El selinexor tiene una toxicidad menor que LMB en los fibroblastos normales y HGPS.
2. El tratamiento con selinexor mitiga la senescencia de los fibroblastos HGPS.
3. El tratamiento con selinexor restablece la morfología mitocondrial y reduce el nivel de ROS.
4. El selinexor induce la degradación de progerina mediante la activación de la autofagia.

REFERENCIAS

- Angus, L., van der Watt, P. J., & Leaner, V. D. (2014). Inhibition of the nuclear transporter, Kpn β 1, results in prolonged mitotic arrest and activation of the intrinsic apoptotic pathway in cervical cancer cells. *Carcinogenesis*, 35(5), 1121–1131. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt491>
- Arciuch, V. G. A., Elguero, M. E., Poderoso, J. J., & Carreras, M. C. (2012). Mitochondrial regulation of cell cycle and proliferation. In *Antioxidants and Redox Signaling* (Vol. 16, Issue 10, pp. 1150–1180). <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4085>
- Buchwalter, A., & Hetzer, M. W. (2017). Nucleolar expansion and elevated protein translation in premature aging. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00322-z>
- Cao, K., Graziotto, J. J., Blair, C. D., Mazzulli, J. R., Erdos, M. R., Krainc, D., & Collins, F. S. (2011). Rapamycin reverses cellular phenotypes and enhances mutant protein clearance in Hutchinson-Gilford progeria syndrome cells. *Science Translational Medicine*, 3(89). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002346>
- Capell, B. C., Collins, F. S., & Nabel, E. G. (2007). Mechanisms of cardiovascular disease in accelerated aging syndromes. In *Circulation Research* (Vol. 101, Issue 1, pp. 13–26). <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.153692>
- Cisneros, B., & García-Aguirre, I. (2020). Nuclear protein export pathway in aging therapeutics. *Aging*, 12(6), 4682–4684. <https://doi.org/10.18632/aging.102948>
- de Sandre-Giovannoli, A., Bernard, R., Cau, P., Navarro, C., Amiel, J., Boccaccio, I., Lyonnet, S., Stewart, C. L., Munnich, A., le Merrer, M., & Lévy, N. (2003). Lamin A truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science*, 300(5628), 2055. <https://doi.org/10.1126/science.1084125>
- 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., & Collins, F. S. (2003). Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson Gilford. *Nature*, 423, 293–298.
- FDA. (2020, December 18). *FDA approves selinexor for refractory or relapsed multiple myeloma*. <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-selinexor-refractory-or-relapsed-multiple-myeloma>
- Fleta-Soriano, E., Martinez, J. P., Hinkelmann, B., Gerth, K., Washausen, P., Diez, J., Frank, R., Sasse, F., & Meyerhans, A. (2014). The myxobacterial metabolite ratjadone A inhibits HIV infection by blocking the Rev/CRM1-mediated nuclear export pathway. *Microbial Cell Factories*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-17>
- 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/accel.13002>
- Girdhar, A., & Guo, L. (2022). Regulating Phase Transition in Neurodegenerative Diseases by Nuclear Import Receptors. In *Biology* (Vol. 11, Issue 7). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biology11071009>
- Glynn, M. W., & Glover, T. W. (2005). Incomplete processing of mutant lamin A in Hutchinson–Gilford progeria leads to nuclear abnormalities, which are reversed by farnesyltransferase inhibition. *Human Molecular Genetics*, 14(20), 2959–2969. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi326>
- Goldman, R. D., Shumaker, D. K., Erdos, M. R., Eriksson, M., Goldman, A. E., Gordon, L. B., Gruenbaum, Y., Khuon, S., Mendez, M., Varga, R., & Collins, F. S. (2004). Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0402943101
- Gonzalo, S., Kreienkamp, R., & Askjaer, P. (2017). Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome: A premature aging disease caused by LMNA gene mutations. In *Ageing Research Reviews* (Vol. 33, pp. 18–29). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.06.007>
- Gordon, L. B., Rothman, F. G., López-Otín, C., & Misteli, T. (2014). Progeria: A paradigm for translational medicine. In *Cell* (Vol. 156, Issue 3, pp. 400–407). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.028>
- Gorlich, D., Pante, N., Kutay, U., Aebi, U., & Bischoff, F. (1996). Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. In *The EMBO Journal* (Vol. 15, Issue 20).
- Gravina, G. L., Mancini, A., Sanita, P., Vitale, F., Marampon, F., Ventura, L., Landesman, Y., McCauley, D., Kauffman, M., Shacham, S., & Festuccia, C. (2015). KPT-330, a potent and selective exportin-1 (XPO-1) inhibitor, shows antitumor effects modulating the expression of cyclin D1 and surviving in prostate cancer models. *BMC Cancer*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1936-z>
- Gravina, G. L., Senapedis, W., McCauley, D., Baloglu, E., Shacham, S., & Festuccia, C. (2014). Nucleo-cytoplasmic transport as a therapeutic target of cancer. In *Journal of Hematology and Oncology* (Vol. 7, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13045-014-0085-1>
- Harhour, K., Navarro, C., Depetris, D., Mattei, M., Nissan, X., Cau, P., De Sandre-Giovannoli, A., & Lévy, N. (2017). MG 132-induced progerin clearance is mediated by autophagy activation and splicing regulation. *EMBO Molecular Medicine*, 9(9), 1294–1313. <https://doi.org/10.15252/emmm.201607315>
- Henderson, B. R. (2000). Nuclear-cytoplasmic shuttling of APC regulates β -catenin subcellular localization and turnover. *Nature Cell Biology*, 2, 653–660.

- Hennekam, R. C. M. (2006). Hutchinson-Gilford progeria syndrome: Review of the phenotype. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 140(23), 2603–2624. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.31346>
- Ishizawa, J., Kojima, K., Hail, N., Tabe, Y., & Andreeff, M. (2015). Expression, function, and targeting of the nuclear exporter chromosome region maintenance 1 (CRM1) protein. In *Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 153, pp. 25–35). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.06.001>
- Kalid, O., Toledo Warshaviak, D., Shechter, S., Sherman, W., & Shacham, S. (2012). Consensus Induced Fit Docking (ciFD): methodology, validation, and application to the discovery of novel Crm1 inhibitors. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 26(11), 1217–1228. <https://doi.org/10.1007/s10822-012-9611-9>
- Kelley, J. B., Datta, S., Snow, C. J., Chatterjee, M., Ni, L., Spencer, A., Yang, C.-S., Cubeñas-Potts, C., Matunis, M. J., & Paschal, B. M. (2011). The Defective Nuclear Lamina in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome Disrupts the Nucleocytoplasmic Ran Gradient and Inhibits Nuclear Localization of Ubc9. *Molecular and Cellular Biology*, 31(16), 3378–3395. <https://doi.org/10.1128/mcb.05087-11>
- Kubben, N., & Misteli, T. (2017). Shared molecular and cellular mechanisms of premature ageing and ageing-associated diseases. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 18, Issue 10, pp. 595–609). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.68>
- Kudo, N., Khochbin, S., Nishi, K., Kitano, K., Yanagida, M., Yoshida, M., & Horinouchi, S. (1997). Molecular cloning and cell cycle-dependent expression of mammalian CRM1, a protein involved in nuclear export of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 272(47), 29742–29751. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.47.29742>
- Kumar, A. V., & Lapiere, L. R. (2021). Location, location, location: subcellular protein partitioning in proteostasis and aging. In *Biophysical Reviews* (Vol. 13, Issue 6, pp. 931–941). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s12551-021-00890-x>
- Kuusisto, H. V., & Jans, D. A. (2015). Hyper-dependence of breast cancer cell types on the nuclear transporter Importin β 1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1853(8), 1870–1878. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.05.002>
- Landes, J. R., Moore, S. A., Bartley, B. R., Doan, H. Q., Rady, P. L., & Tying, S. K. (2023). The efficacy of selinexor (KPT-330), an XPO1 inhibitor, on non-hematologic cancers: a comprehensive review. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 149(5), 2139–2155. <https://doi.org/10.1007/s00432-022-04247-z>
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. In *Cell* (Vol. 153, Issue 6, p. 1194). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>
- Mahipal, A., & Malafa, M. (2016). Importins and exportins as therapeutic targets in cancer. *Pharmacology & Therapeutics*, 164, 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.03.020>

- Martins, F., Sousa, J., Pereira, C. D., da Cruz e Silva, O. A. B., & Rebelo, S. (2020). Nuclear envelope dysfunction and its contribution to the aging process. In *Aging Cell* (Vol. 19, Issue 5). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/accel.13143>
- Merideth, M. A., Gordon, L. B., Clauss, S., Sachdev, V., Smith, A. C. M., Perry, M. B., Brewer, C. C., Zalewski, C., Kim, H. J., Solomon, B., Brooks, B. P., Gerber, L. H., Turner, M. L., Domingo, D. L., Hart, T. C., Graf, J., Reynolds, J. C., Gropman, A., Yanovski, J. A., ... Introne, W. J. (2008). Phenotype and Course of Hutchinson–Gilford Progeria Syndrome. *New England Journal of Medicine*, 358(6), 592–604. <https://doi.org/10.1056/nejmoa0706898>
- Monterrubio-Ledezma, F., Navarro-García, F., Massieu, L., Mondragón-Flores, R., Soto-Ponce, L. A., Magaña, J. J., & Cisneros, B. (2023). Rescue of Mitochondrial Function in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome by the Pharmacological Modulation of Exportin CRM1. *Cells*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/cells12020275>
- Newlands, E. S., Rustin, G., & Brampton, M. H. (1996). Phase I trial of elactocin. In *British Journal of Cancer* (Vol. 74).
- Nishi, K., Yoshida, M., Fujiwara, D., Nishikawa, M., Horinouchi, S., & Beppu, T. (1994). Leptomycin B targets a regulatory cascade of crm1, a fission yeast nuclear protein, involved in control of higher order chromosome structure and gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 269(9), 6320–6324. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)37374-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)37374-x)
- Parikh, K., Cang, S., Sekhri, A., & Liu, D. (2014). *Selective inhibitors of nuclear export (SINE)-a novel class of anti-cancer agents*. <http://www.jhoonline.org/content/7/1/78>
- Park, J. H., Ryu, S. J., Kim, B. J., Cho, H. J., Park, C. H., Choi, H. J. C., Jang, E. J., Yang, E. J., Hwang, J. A., Woo, S. H., Lee, J. H., Park, J. H., Choi, K. M., Kwon, Y. Y., Lee, C. K., Park, J. T., Cho, S. C., Lee, Y. Il, Lee, S. B., ... Park, S. C. (2021). Disruption of nucleocytoplasmic trafficking as a cellular senescence driver. *Experimental and Molecular Medicine*, 53(6), 1092–1108. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00643-6>
- Ranganathan, P., Yu, X., Na, C., Santhanam, R., Shacham, S., Kauffman, M., Walker, A., Klisovic, R., Blum, W., Caligiuri, M., Croce, C. M., Marcucci, G., & Garzon, R. (2012). Preclinical activity of a novel CRM1 inhibitor in acute myeloid leukemia. *Blood*, 120(9), 1765–1773. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-04-423160>
- Silvestrini, M. J., Johnson, J. R., Kumar, A. V., Thakurta, T. G., Blais, K., Neill, Z. A., Marion, S. W., St. Amand, V., Reenan, R. A., & Lapierre, L. R. (2018). Nuclear Export Inhibition Enhances HLH-30/TFEB Activity, Autophagy, and Lifespan. *Cell Reports*, 23(7), 1915–1921. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.063>
- Son, S. M., Park, S. J., Breusegem, S. Y., Larrieu, D., & Rubinsztein, D. C. (2024). p300 nucleocytoplasmic shuttling underlies mTORC1 hyperactivation in Hutchinson–Gilford progeria syndrome. *Nature Cell Biology*, 26(2), 235–249. <https://doi.org/10.1038/s41556-023-01338-y>
- Stelma, T., Chi, A., Van Der Watt, P. J., Verrico, A., Lavia, P., & Leaner, V. D. (2016). Targeting nuclear transporters in cancer: Diagnostic, prognostic and therapeutic

- potential. In *IUBMB Life* (Vol. 68, Issue 4, pp. 268–280). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/iub.1484>
- Stochaj, U., Kodiha, M., Shum-Tim, D., & Colmegna, I. (2013). Implications of multipotent mesenchymal stromal cell aging. In *Regenerative Medicine* (Vol. 8, Issue 2, pp. 211–222). <https://doi.org/10.2217/rme.13.10>
- Sun, Q., Carrasco, Y. P., Hu, Y., Guo, X., Mirzaei, H., MacMillan, J., & Chook, Y. M. (2013). Nuclear export inhibition through covalent conjugation and hydrolysis of Leptomycin B by CRM1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(4), 1303–1308. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217203110>
- Viteri, G., Chung, Y. W., & Stadtman, E. R. (2010). Effect of progerin on the accumulation of oxidized proteins in fibroblasts from Hutchinson Gilford progeria patients. *Mechanisms of Ageing and Development*, 131(1), 2–8. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2009.11.006>
- Worman, H. J., Ostlund, C., & Wang, Y. (2010). Diseases of the nuclear envelope. In *Cold Spring Harbor perspectives in biology* (Vol. 2, Issue 2). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000760>
- Xiong, Z. M., Choi, J. Y., Wang, K., Zhang, H., Tariq, Z., Wu, D., Ko, E., Ladana, C., Sesaki, H., & Cao, K. (2016). Methylene blue alleviates nuclear and mitochondrial abnormalities in progeria. *Aging Cell*, 15(2), 279–290. <https://doi.org/10.1111/acel.12434>
- Young, S. G., Fong, L. G., & Michaelis, S. (2005). Prelamin A, Zmpste24, misshapen cell nuclei, and progeria - New evidence suggesting that protein farnesylation could be important for disease pathogenesis. In *Journal of Lipid Research* (Vol. 46, Issue 12, pp. 2531–2558). <https://doi.org/10.1194/jlr.R500011-JLR200>
- Zhang, K., Wang, M., Tamayo, A. T., Shacham, S., Kauffman, M., Lee, J., Zhang, L., Ou, Z., Li, C., Sun, L., Ford, R. J., & Pham, L. V. (2013). Novel selective inhibitors of nuclear export CRM1 antagonists for therapy in mantle cell lymphoma. *Experimental Hematology*, 41(1). <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2012.09.002>