



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Efecto de la inhibición de CRM1 sobre el fenotipo secretor asociado a
senescencia en fibroblastos de pacientes con síndrome de progeria de
Hutchinson-Gilford”**

T E S I S

Que presenta

Lic. en Q.F.BT. ALEJANDRA TORIBIO VALDEZ

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

En la especialidad de

GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Directores de tesis:

Dr. Bulmaro Cisneros Vega

Dr. Ian Alain García Aguirre

Ciudad de México

Septiembre, 2023

ASESORES

Dr. Bulmaro Cisneros Vega

Investigador titular

Departamento de Genética y Biología Molecular

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional

Dr. Ian Alain García Aguirre

Departamento de Bioingeniería

Escuela de Ingeniería y Ciencias

Tecnológico de Monterrey, Ciudad de México, México

Dr. Efraín Garrido Guerrero

Investigador titular

Departamento de Genética y Biología Molecular

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional

Dr. José Manuel Hernández Hernández

Investigador titular

Departamento de Genética y Biología Molecular

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 12 del departamento de Genética y Biología Molecular en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección del Dr. Bulmaro Cisneros Vega y con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) al que hago el extensivo agradecimiento por permitirme realizar mis estudios de maestría.

DEDICATORIA

A mi esposo David, mi compañero de vida ♡

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores el Dr. Bulmaro y el Dr. Ian por ser parte de mi aprendizaje durante esta etapa, gracias por permitirme ser parte del laboratorio.

A mis asesores el Dr. Hernández y el Dr. Garrido por sus consejos durante el proceso del proyecto.

Al Dr. Salomón y al Dr. Victor de la Universidad Panamericana por permitirme realizar una parte del proyecto en su laboratorio, gracias por sus enseñanzas y los buenos consejos.

A todo el laboratorio 12 porque no solo fueron parte de mi formación académica, también agradezco los buenos momentos, sobre todo a Gaby, Tania y Juan, por ser mis amigos y estar en las buenas y en las malas, por los consejos y las noches de juegos. Siempre los voy a llevar en mi corazón.

A mi familia, sobre todo a mis papas, mi hermana y mi David, por apoyarme desde que tomé la decisión de entrar a la maestría y ser un apoyo incondicional. Gracias por no dejarme caer ni en los momentos más difíciles.

RESUMEN

El estudio del envejecimiento ha sido un blanco importante para la biología molecular durante los últimos años, debido al interés por encontrar estrategias terapéuticas para mejorar la esperanza de vida. El estudio del síndrome de progeria Hutchinson-Gilford (HGPS) ha permitido caracterizar las marcas moleculares asociadas con el envejecimiento debido a que esta enfermedad comparte características fenotípicas y funcionales con el envejecimiento natural. El HGPS es provocado por una mutación puntual en el gen LMNA. Previamente nuestro grupo observó que la exportina CRM1 está sobre-expresada en el HGPS, y que su inhibición farmacológica utilizando selinexor (inhibidor específico de CRM1) mitiga diferentes marcas asociadas con la senescencia celular, incluyendo las morfologías aberrantes de la célula y el núcleo, el aumento del área nucleolar y la disminución de la heterocromatina. En este trabajo utilizamos fibroblastos primarios de piel obtenidos de pacientes con HGPS con la finalidad de analizar si la inhibición de CRM1 utilizando selinexor alivia el fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP). Para abordar este objetivo medimos los transcritos de diferentes componentes del SASP mediante RT-PCR cuantitativo, empleando muestras de RNA total obtenidas de células HGPS tratadas por 6 días con selinexor o con el vehículo solamente. Observamos que no existe un aumento del ARNm de los factores proinflamatorios IL1B, IL6, TNF y RELA en los fibroblastos HGPS; no obstante, el tratamiento con selinexor disminuyó significativamente la expresión transcripcional de los componentes mencionados en las células HGPS, lo que sugiere que el selinexor tiene un efecto senomórfico. Por otra parte, abordamos una segunda estrategia para disminuir la actividad de CRM1 que consistió en el uso independiente o combinado de tres diferentes shRNAs dirigidos contra CRM1. Obtuvimos una ligera pero significativa disminución de CRM1 en las células HeLa mediante el empleo del shRNA número 3. En conclusión, es necesario extender el análisis del efecto de la inhibición de CRM1 sobre la senescencia celular, incluyendo el SASP, para definir si CRM1 puede ser considerado un blanco terapéutico contra el HGPS.

ABSTRACT

The study of aging is currently a relevant issue in the biomedical field, due to the growing interest in finding experimental therapies to improve lifespan. The study of Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS) has allowed characterizing the molecular basis of aging because it shares phenotypic and physiological characteristics with natural aging. HGPS is caused by a point mutation on the LMNA gene. Previously, our laboratory found that CRM1 exportin is abnormally overexpressed in HGPS cells and that the pharmacologic inhibition of CRM1 using selinexor (a specific CRM1 inhibitor) prevented different senescence-associated marks, including cellular and nuclear aberrant morphologies, nucleolar expansion, and decreased heterochromatin. In this work, we used primary dermal fibroblasts obtained from patients with HGPS to analyze whether inhibition of CRM1 using selinexor alleviates the senescence-associated secretory phenotype (SASP). To approach this goal, RNA samples from wild type (WT) and HGPS cells treated with selinexor or the vehicle alone were analyzed by qRT-PCR using specific primers to measure the mRNA of different SASP members. We found no increase in the expression of proinflammatory factors IL1B, IL6, TNF and RELA in HGPS fibroblasts; however, selinexor treatment significantly decreased the expression of the aforementioned components in HGPS cells, compared with WT cells. These data suggest that selinexor has a senomorphic effect. On the other hand, we approached a strategy to knockdown CRM1 expression using different shRNAs specific to CRM1. We obtained a subtle but significant decrease of CRM1 in HeLa cells with shRNA # 3. In summary, the analysis of the effect of CRM1 inhibition on cellular senescence, including SASP, requires further experimentation, to define whether CRM1 can be considered as a therapeutic target against HGPS.

ÍNDICE

ASESORES	2
DEDICATORIA	4
AGRADECIMIENTOS	5
ABSTRACT	7
ÍNDICE	8
ÍNDICE DE FIGURAS	10
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1 Envejecimiento	11
1.2 Síndromes progeroides	11
1.3 El síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford (HGPS)	12
1.3.1 Alteraciones celulares causadas por progerina	14
1.2 Senescencia celular.....	15
1.2.1 Tipos de senescencia.....	16
1.2.2 Marcadores de senescencia.....	16
1.3 Fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP).....	18
1.3.1 Regulación del SASP	20
1.3.3 Factor nuclear κ B (NF- κ B).....	22
1.3.4 Presencia de SASP en el HGPS	25
1.4 Trafico nuclear de proteínas	26
1.4.1 La exportina CRM1.....	28
1.4.2 Inhibición de CRM1	28
2. ANTECEDENTES	30
3. JUSTIFICACIÓN	34
4. HIPÓTESIS	34
5. OBJETIVOS	34
5.1 General:.....	34
5.2 Específicos:.....	35
6. DISEÑO EXPERIMENTAL	35
7. MODELO DE ESTUDIO	36

8. METODOLOGÍA.....	37
7.1 Cultivo celular	37
7.2 Extracción de ARN	37
7.3 Síntesis de ADN complementario	38
7.4 RT-PCR en tiempo real	38
7.5 Bacterias competentes	38
7.6 Transformación bacteriana	39
7.7 Extracción de ADN plasmídico	39
7.7.1 Miniprep casera.....	39
7.7.2 Midiprep.....	40
7.8 Transfección	40
7.9 Extracción de proteínas totales	40
7.10 Inmunodetección en fase sólida	41
7.11 Anticuerpos.....	42
8. RESULTADOS	43
8.1 Los fibroblastos de pacientes con HGPS presentan un aumento de la expresión del transcrito del gen IL1B.....	43
8.2 El tratamiento con selinexor disminuye la expresión de diferentes componentes del SASP en los fibroblastos HGPS.....	44
8.3 Silenciamiento de la expresión de CRM1 en las células HeLa empleando vectores que expresan shRNAs.....	46
9. DISCUSIÓN	48
10. CONCLUSIONES	51
11. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	52
12. BIBLIOGRAFÍA	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Comparación del procesamiento normal de la lámina A con el de la progerina.....	13
Figura 2. Presencia de marcas de senescencia en las células de pacientes con HGPS.....	14
Figura 3. Marcadores generales de la senescencia celular.....	18
Figura 4. Mecanismos involucrados en la regulación del SASP	21
Figura 5. Miembros de la familia NF- κ B en mamíferos	23
Figura 6. Regulación de la activación de NF- κ b.....	24
Figura 7. Mecanismo de exportación nuclear mediado por CRM1.	27
Figura 8. La sobreexpresión de CRM1 en los fibroblastos HGPS ocasiona la deslocalización de proteínas que contienen NES.....	30
Figura 9. La inhibición de CRM1 previene la senescencia celular mediante el incremento de los niveles de lámina B1.....	33
Figura 10. Expresión transcripcional de los genes IL1B, IL6, TNF y RELA en los fibroblastos HGPS.....	43
Figura 11. Efecto del selinexor sobre la expresión de los genes IL1B, IL6, TNF y RELA en los fibroblastos HGPS.....	45
Figura 12. Silenciamiento de la expresión de CRM1 en las células HeLa mediante la utilización de shRNAs.....	47

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Envejecimiento

El envejecimiento se define como un declive fisiológico y cognitivo del individuo, asociado con alteraciones metabólicas, lo que resulta en una mayor vulnerabilidad al medio ambiente, un mayor riesgo de contraer enfermedades y de morir. Uno de los desafíos de la investigación biomédica es descifrar los mecanismos moleculares que subyacen el envejecimiento; sin embargo, el uso del humano como modelo de estudio es complicado por cuestiones éticas y económicas. En su lugar se han usado modelos de organismos inferiores de vida corta, como la levadura, el gusano *Caenorhabditis elegans*, la mosca *Drosophila melanogaster* y el ratón *Mus musculus*. Estos modelos han facilitado la identificación de genes implicados en el envejecimiento y fármacos que incrementan la esperanza de vida de estos organismos; no obstante, su extrapolación al humano no es directa. Una estrategia alternativa para la investigación del envejecimiento es el estudio de los síndromes progeroides, un grupo de enfermedades genéticas raras caracterizadas por el envejecimiento acelerado, las cuales constituyen una fuente invaluable de información para entender como envejecemos (García-Aguirre, I. et al 2020).

1.2 Síndromes progeroides

Los síndromes progeroides son un grupo de enfermedades monogénicas que recrean aspectos del envejecimiento normal. Estos síndromes se clasifican en dos grupos principales. El primero incluye enfermedades causadas por mutaciones en genes de la vía de reparación del ADN, que se relacionan con daño de los telómeros. El segundo grupo incluye síndromes originados por mutaciones en genes que codifican para para las láminas A y C, proteínas esenciales de la envoltura nuclear. Una enfermedad de este grupo que se ha estudiado extensivamente es el síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford (HGPS) (Dressen, O., 2020; Ashapkin, V. V. et al., 2019).

1.3 El síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford (HGPS)

El HGPS es una enfermedad rara con una incidencia de 1 en cada 4-8 millones de personas. Los niños nacidos con HGPS no presentan alteraciones al nacimiento, pero después de un año comienzan a presentar características fenotípicas de envejecimiento. Las alteraciones faciales típicas incluyen micrognatia (mandíbula pequeña), desproporción craneofacial, alopecia, ojos saltones y venas prominentes. Los niños experimentan retraso del crecimiento y pérdida de peso, y mueren entre los 13 y 14 años de vida por infarto al miocardio o accidente cerebrovascular, causado por aterosclerosis progresiva de las arterias coronaria y cerebrovascular (Pollex, R. L. et al., 2004; Ashapkin, V. V. et al., 2019).

Específicamente, el HGPS es causado por una mutación puntual en el exón 11 del gen LMNA localizado en el cromosoma 1q21.2-q21.3 (Saxena, S. et al., 2020; Pollex, R. L. et al., 2004). Este gen codifica para 4 proteínas (A, C, CD10 y C2) mediante splicing alternativo, siendo las más abundantes las láminas A y C. La lámina A es sintetizada como un precursor denominado prelámina A, que posteriormente se modifica post-traduccionalmente para formar la lámina A madura de 646 residuos. La cisteína de región -CAAX del extremo C-terminal de la lámina A se farnesila y después se cortan los últimos tres residuos. Estas modificaciones facilitan la asociación de la prelámina A con la envoltura nuclear. Subsecuentemente, la endoproteasa Zmpste24 (FACE-1) corta los últimos 15 residuos, incluyendo el residuo carboximetilado y farnesilado, dando lugar a la lámina A madura que presenta una mayor flexibilidad y aporta estabilidad al núcleo (Figura 1). En el HGPS, la mutación sobre la lámina A genera un mayor reconocimiento de un sitio crítico de splicing en el exón 11 que ocasiona la eliminación de 150 nucleótidos, lo que se traduce en la pérdida de 50 aminoácidos cerca del sitio C terminal de la prelámina A. Esto ocasiona la pérdida del sitio de reconocimiento de la endoproteasa Zmpste24, lo cual lleva a la generación de progerina, la cual retiene la cisteína con el farnesilo y la carboximetilación (Figura 1). La progerina se asocia con la membrana

nuclear interna, causando distintas alteraciones (Gonzalo, S. et al., 2016; Saxena, S. et al., 2020). Esto se debe a que las láminas tipo A, en conjunto con las de tipo B, son los principales componentes de la lámina nuclear, y participan en el mantenimiento de la estructura nuclear, la organización de la cromatina, la replicación del ADN y la expresión de genes. Además, esta estructura nuclear regula otros procesos como el anclaje de la cromatina con la periferia nuclear (Ashapkin, V. V. et al., 2019; Pollex, R. L. et al., 2004).

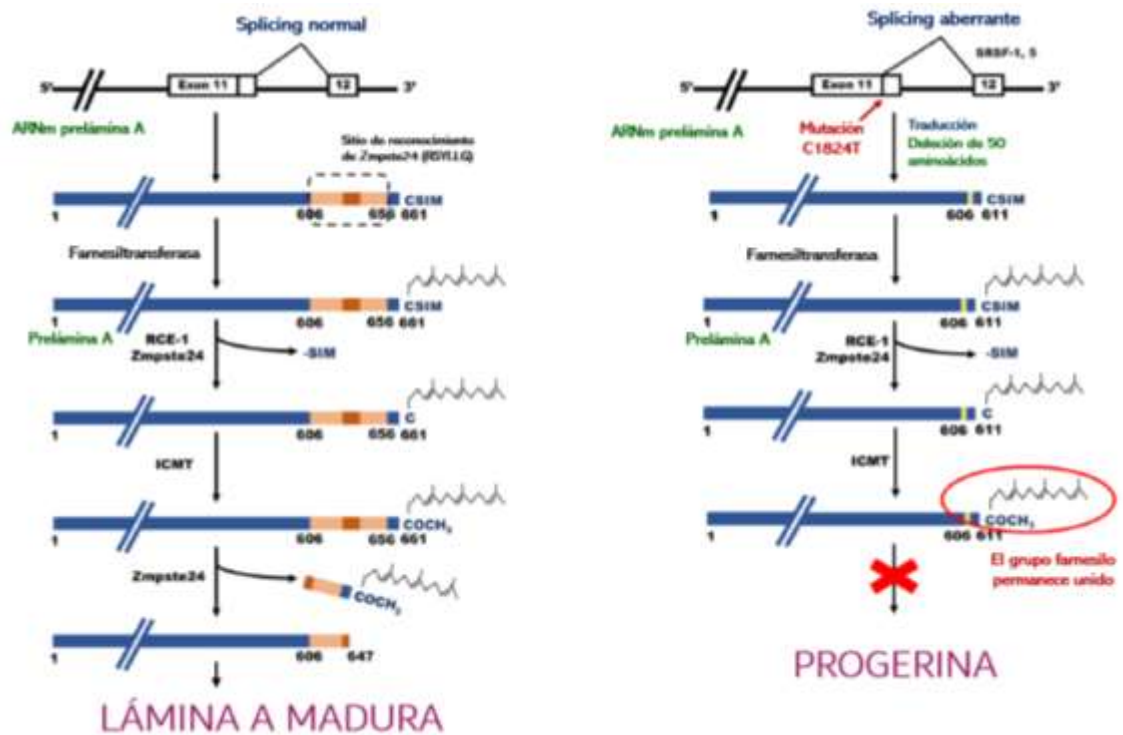


Figura 1. Comparación del procesamiento normal de la lámina A con el de la progerina. En el HGPS se reconoce un sitio crítico de splicing que lleva a la delección de 150 nucleótidos en el exón 11 del gen LMNA. El producto es una lámina nuclear aberrante denominada progerina, que es la causante de diversas alteraciones asociadas con la senescencia celular. Tomado y modificado de Gonzalo, S. et al., 2016.

1.3.1 Alteraciones celulares causadas por progerina

La expresión de progerina daña la morfología del núcleo, originando invaginaciones, protuberancias y una agrupación anormal de complejos del poro nuclear. El núcleo se vuelve más rígido y resistente a fuerzas mecánicas (Dressen, O. 2020). Por otro lado, esta perturbación afecta la mitosis, la función mitocondrial, la replicación y reparación del ADN y la transcripción (Dressen, O., 2020; Ashapkin, V. V. et al., 2019; Gonzalo, 2016). De forma similar a lo que ocurre en células humanas de una persona anciana, las células provenientes de pacientes con HGPS exhiben marcas de senescencia celular, incluyendo pérdida de heterocromatina periférica (reducción de las marcas H3K9me3 y H3K27me3), activación de la respuesta de daño al ADN, acortamiento de telómeros, incremento de las especies reactivas de oxígeno (ROS), e inestabilidad genómica (Figura 2) (Dreesen, O., 2020; Eriksson, M. et al., 2003).

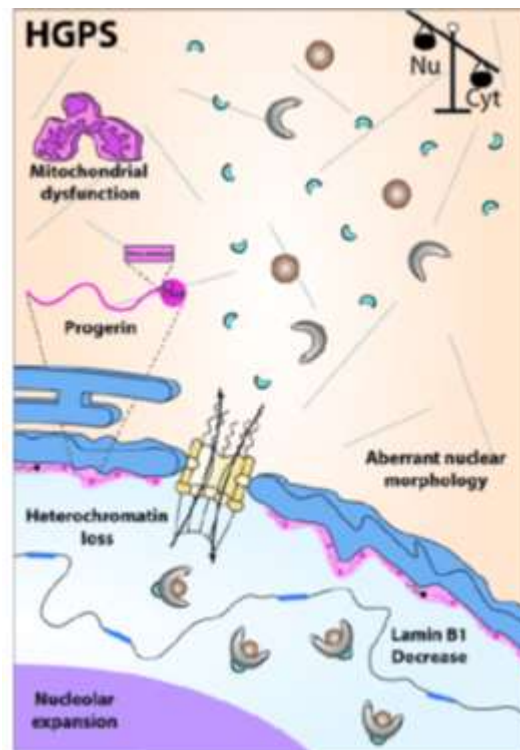


Figura 2. Presencia de marcas de senescencia en las células de pacientes con HGPS. Tomado de Cisneros, V. 2020.

1.2 Senescencia celular

El concepto de senescencia surgió a partir de las observaciones de Hayflick y Moorehead en 1961, donde los autores describieron que fibroblastos humanos en cultivo no crecen infinitamente como las células cancerígenas, sino que se detiene poco a poco su proliferación hasta parar por completo su crecimiento. Estos autores concluyeron que el tiempo de vida finito de las células diploides se debe a su envejecimiento (senescencia celular). Actualmente sabemos que la senescencia es un fenómeno que ocurre *in vitro* e *in vivo* y que es un proceso irreversible de arresto del ciclo celular, acompañado por alteraciones en la morfología de la células y de sus organelos y la desregulación general del metabolismo (Kuilman, T. et al., 2010; Cristofalo, V. J. et al., 2004). La senescencia celular puede ser inducida por diferentes tipos de estrés como el agotamiento replicativo, la activación de oncogenes, la disfunción mitocondrial, el tratamiento con quimioterapéuticos, y la irradiación (Ogrodnik, M. 2020; Herranz, N. 2018; Birch, J. 2020). En cuanto al fenómeno que se observa *in vitro*, se sabe que los cultivos tienen una vida finita debido a la senescencia replicativa inducida principalmente por el acortamiento de los telómeros, fenómeno definido por el “límite de Hayflick”, que refiere al punto máximo de proliferación (Kuilman, T. et al. 2010; Ogrodnik, M. 2020). Para la identificación de células senescentes es necesario analizar más de dos marcadores diferentes de senescencia, de tal forma que las células senescentes se distingan de células con arresto de ciclo celular debido a la quiescencia o la diferenciación terminal (Hernandez-Segura, A., et al, 2018). Entre las marcas de senescencia se incluyen la actividad de la enzima β -galactosidasa asociada a senescencia, la expresión de supresores de tumores y/o inhibidores del ciclo celular y algunos marcadores de daño al ADN, focos nucleares de heterocromatina constitutiva y la secreción de moléculas señalizadoras (Muñoz-Espín, D. 2014). Las células senescentes se caracterizan por su arresto en la fase G0/G1 o la fase G2/M del ciclo celular (Sikora, E. et al., 2018).

1.2.1 Tipos de senescencia

La senescencia es causada por diferentes tipos de estrés, por lo que su clasificación depende del tipo de inductor. Estos se dividen en tres grandes grupos: senescencia replicativa, senescencia inducida por oncogenes y senescencia prematura (Ogrodnik, M. 2021; Collado, M. et al., 2006). La senescencia replicativa es causada por el acortamiento progresivo de los telómeros, lo que ocasiona que las células alcancen el “límite de Hayflick” (Xu, Z. et al., 2013). Los telómeros se desgastan debido a que la ADN polimerasa falla para completar la replicación de las cadenas retrasadas del ADN; por lo tanto, los telómeros actúan como un reloj molecular que refleja la historia replicativa las células. La pérdida de la longitud de los telómeros desencadena la respuesta de daño al ADN, donde los principales mediadores son las cinasas ATM, ATR, CHK1 y CHK2, las cuales fosforilan y activan diversas moléculas del ciclo celular como p53 para promover el arresto celular que caracteriza a la senescencia (Kuilman, T. et al., 2010). La senescencia inducida por oncogenes no depende directamente del acortamiento de telómeros y se origina por señales proliferativas aberrantes causadas por oncogenes. La senescencia es un mecanismo potencial de supresión de tumores, ya que detiene la proliferación de células dañadas y mantiene los tumores en un estado premaligno menos agresivo (Collado, M. et al., 2006; Kuilman, 2010). Por otro lado, la senescencia inducida por estrés incluye daño al ADN, estrés oxidativo, y condiciones de cultivo subóptimas, entre otros. Estos factores están asociados con la estabilización de p53, lo que resulta en la activación transcripcional de p21, (inhibidor del complejo ciclina E/Cdk2). La inhibición de este complejo permite a su vez mantener hipofosforilada a Rb para inhibir el ciclo celular (Chen, J. et al., 2006).

1.2.2 Marcadores de senescencia

Existen diversos marcadores para la identificación de células senescentes, pero ninguno de ellos es único o exclusivo, por lo que es

necesario evaluar una combinación de marcas de senescencia para inequívocamente identificar estas células (Ogrodnik, M. 2021; Kuilman, T. et al., 2010). El marcador más usado es la actividad de la enzima β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -Gal). La actividad alta de esta enzima está asociada con la incrementada actividad lisosomal en las células senescentes. Sin embargo, este marcador tiene algunas limitaciones debido a que también puede detectarse en células inmortalizadas y células quiescentes bajo inanición, además puede dar falsos-positivos en macrófagos y otras células pro-inflamatorias (Collado, M. et al., 2006; Magalhaes, J. P. et al., 2018). Las células senescentes son grandes, aplanadas y en algunos casos multinucleadas (Kuilman, T. et al., 2010), por lo que la visualización de la morfología celular bajo el microscopio óptico o confocal permite también su identificación. Otras características que se encuentran asociadas con la senescencia celular son la ausencia de marcadores de proliferación, pérdida de heterocromatina, daño al ADN asociado a los telómeros, y la expresión de los inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas, p21 y p16 (Magalhaes, J. P. et al., 2018). En la senescencia inducida por oncogenes se presentan regiones de heterocromatina conocidos como focos de heterocromatina asociados a senescencia (SAHF), los cuales son positivos a marcadores de heterocromatina como la trimetilación de la lisina 9 en la histona 3 (H3K9me3) o el reclutamiento de la proteína HP1 γ , por lo que la evaluación de estos marcadores se utiliza rutinariamente para estudiar la senescencia inducida por oncogenes *in vivo* (Collado, M. et al., 2006).

Además del arresto del ciclo celular, las células senescentes experimentan cambios en la expresión génica, el metabolismo, el epigenoma y el perfil secretor, conocido como fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP) (Magalhaes, J. P. et al., 2018).

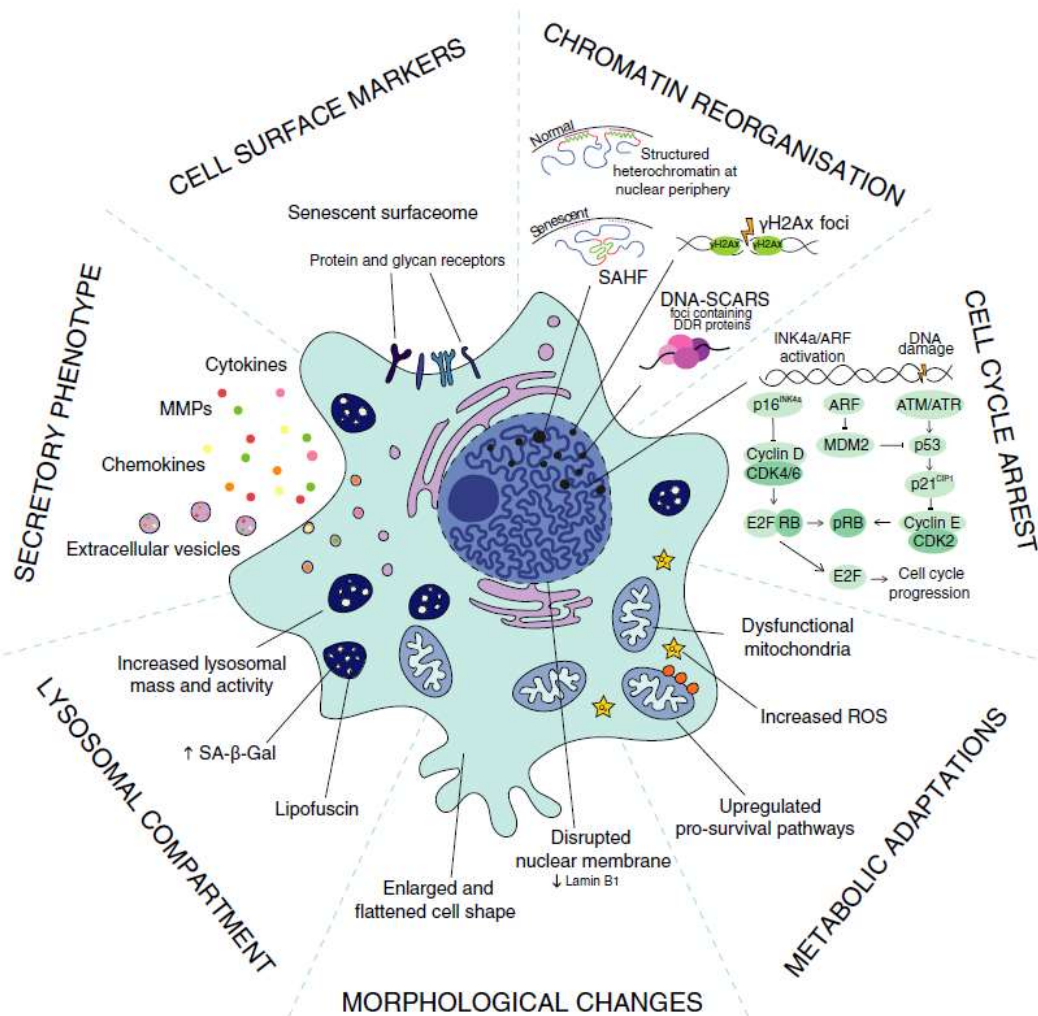


Figura 3. Marcadores generales de la senescencia celular. Mientras que estos marcadores están fuertemente asociados al fenotipo senescente, estos no son exclusivos o indispensables para la implementación del programa (con excepción del arresto del ciclo celular) y no siempre son detectados por completo en células senescentes. Tomado de González-Gualda, E. et al., 2020.

1.3 Fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP)

A pesar de que las células senescentes se encuentran en un estado de arresto del ciclo celular, estas permanecen metabólicamente activas y secretan una gran cantidad de factores. A este secretoma se le conoce como fenotipo secretor asociado a senescencia o SASP (por sus siglas en inglés

“Senescence associated secretory phenotype”) y requiere de un daño prolongado al ADN para que se presente (Kuilman, T. et al., 2010; Kumari, R. et al., 2021). Se cree que el SASP ha evolucionado como una vía de comunicación entre las células senescentes y el sistema inmune, por lo que estas células tienen el potencial de afectar su medio ambiente e influir sobre células vecinas, alterando el comportamiento tanto de células senescentes como no senescentes. Por lo tanto, el SASP no es solo una consecuencia de la senescencia, sino que puede servir al mismo tiempo como inductor de senescencia (Kumari, R. et al., 2021; Magalhaes, J. P. et al., 2018; Shmulevich, R., et al., 2020). Algunos de los inductores del SASP son el acortamiento de los telómeros, el daño genómico, las alteraciones epigenéticas, las señales mitogénicas, el estrés oxidativo y la presencia de restos de cromatina en el citoplasma. Sin embargo, también se han identificado mecanismos independientes del daño al ADN que pueden activar el SASP; por ejemplo, la vía p38 MAPK, la disfunción mitocondrial y el reconocimiento de receptores tipo toll (TLR's). Actualmente se sabe que la composición del SASP depende del tipo de senescencia que se establece en la célula (Lopes-Paciencia, S. et al., 2019; Kumari, R. et al., 2021).

La composición del SASP no se ha dilucidado completamente, pero incluye una plétora de factores de señalización como citocinas pro-inflamatorias, quimiocinas, moduladores de crecimiento, factores angiogénicos, proteasas, lípidos bioactivos, componentes de la matriz extracelular y metaloproteinasas de matriz (MMPs) (Kumari, R. et al., 2021; Magalhaes, J. P. et al., 2018). Entre los factores clave del SASP se incluyen las citocinas pro-inflamatorias IL-6 e IL-8, y entre otros componentes comúnmente identificados se incluyen IL-1 β , IL-1 α , CCL-2, MCPs, MIPs, GM-CSF, GRO α , GRO β , VEGF, TGF β y las metaloproteinasas de matriz (MMP-1, 3 y 10) y PAI-1 (Kumari, R. et al., 2021; Shmulevich, R., et al., 2020; Muñoz-Espín, D. et al., 2014). Las proteínas asociadas al fenotipo senescente pueden ser secretadas al ambiente extracelular de diferentes formas. Una gran cantidad de ellas son producidas como proteínas solubles que pueden ser directamente secretadas, mientras

que otras son inicialmente expresadas como proteínas de membrana y requieren ser secretadas posteriormente (Kumari, R. et al., 2021).

El SASP actúa como un arma de doble filo: puede tener efectos beneficiosos como el reclutamiento del sistema inmunitario hacia lesiones premalignas para promover la reparación de tejido dañado, pero por otra parte la secreción de algunos factores inflamatorios como IL-6, IL-8, cofactores de membrana (MCPs) y proteínas inflamatorias de macrófagos (MIPs) puede causar daño a través de la inducción de proliferación, angiogénesis e inflamación, tanto de forma autócrina como parácrina (Lopes-Paciencia, S. et al., 2019). Por ejemplo, IL-1 α e IL-6 refuerzan la senescencia de manera autócrina (Kumari, R. et al., 2021). Por otro lado, componentes del SASP como TGF β , pueden desencadenar el desarrollo de senescencia en células vecinas de forma parácrina, a través de la generación de ROS y daño al ADN (Muñoz-Espín D. et al., 2014). Además, se ha reportado que el SASP “crónico” induce senescencia en células adyacentes jóvenes, contribuyendo a la disfunción de tejidos y paradójicamente a la tumorigénesis, a través de la estimulación de la proliferación de células tumorales. De manera opuesta, la senescencia puede actuar como un mecanismo autónomo de supresión de tumores, limitando la expansión de células malignas en etapas tempranas (Kuilman, T. et al., 2010; Magalhaes, J. P. et al., 2018).

1.3.1 Regulación del SASP

El SASP es regulado principalmente por dos factores de transcripción, el factor nuclear kB (NF-kB) y la proteína de unión al potenciador beta (c/EBP β) (Shmulevich, R. et al., 2020; Lopes-Paciencia, et al., 2019; Muñoz-Espín, D. et al., 2014). Además, la proteína PARP-1 juega un papel importante en la activación de NF-kB en células senescentes, ya que es un sensor de la respuesta de daño al ADN (Shmulevich, R. et al., 2020). Por otra parte, IGFBP3, IGFBP4 y IGFBP7 son reguladores claves del SASP y se sugiere que

están involucrados en la señalización de la senescencia de forma parácrina (Kumari, R. et al., 2021).

Las vías que se han visto involucradas en la inducción del SASP son p38MAPK, JAK/STAT3, inflammosoma, mTOR, la vía de la fosfoinosítido-3-cinasa (PI3K), HSP90, RNAs no codificantes, GATA4/p62, macroH2A1 y ATM, las cuales a partir de diversos intermediarios llevan a la activación de los dos principales factores mediadores del SASP, NF- κ B y c/EBP β (Figura 3) (Kumari, R. et al., 2021).

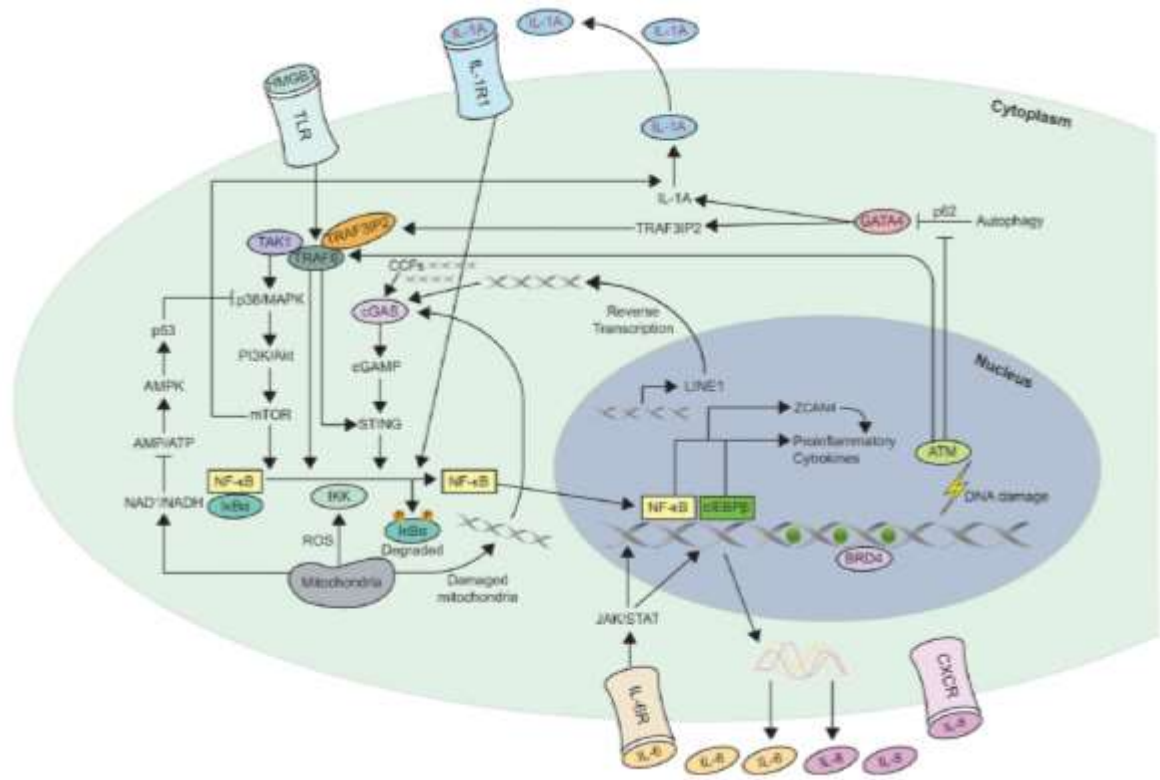


Figura 4. Mecanismos involucrados en la regulación del SASP. Tomado de Kumari, R. et al., 2021.

1.3.3 Factor nuclear κ B (NF- κ B)

Los factores de transcripción NF- κ B controlan un gran número de respuestas inmunológicas e inflamatorias, procesos de desarrollo, crecimiento celular y apoptosis. Estos factores conforman un grupo de complejos homo y hetero diméricos compuesto por todas las posibles combinaciones de los miembros de la familia de polipéptidos NF- κ B. En células de mamíferos estos miembros incluyen a Rel (c-Rel), RelA (p65), RelB, p50/p105 (NF- κ B1) y p52/p100 (NF- κ B2) (Figura 4). El más abundante de esos complejos es el heterodímero compuesto por las subunidades RelA y p50 (Fan, Y. et al., 2013; Bubici, C. et al., 2006). Las proteínas de la familia NF- κ B comparten un dominio de dimerización y de unión a ADN llamado dominio de homología Rel (RHD), el cual se divide en dos clases. La segunda clase (proteínas Rel) contienen dominios de activación de la transcripción C-terminales, e incluye a c-Rel, RelA y RelB. Después de la activación, estas proteínas se translocan al núcleo y se unen en forma de dímeros a sus sitios de reconocimiento en el ADN llamados sitios κ B, los cuales consisten en 9 a 10 pares de bases. Por otro lado, los miembros de la primera clase, p105 y p100 tienen dominios c-terminales largos que contienen múltiples copias de repetidos anquirina, los cuales actúan como inhibidores. Estos miembros se activan únicamente cuando se convierten a sus formas p50 y p52 respectivamente y forman dímeros con miembros de la segunda clase (Fan, Y. et al., 2013).

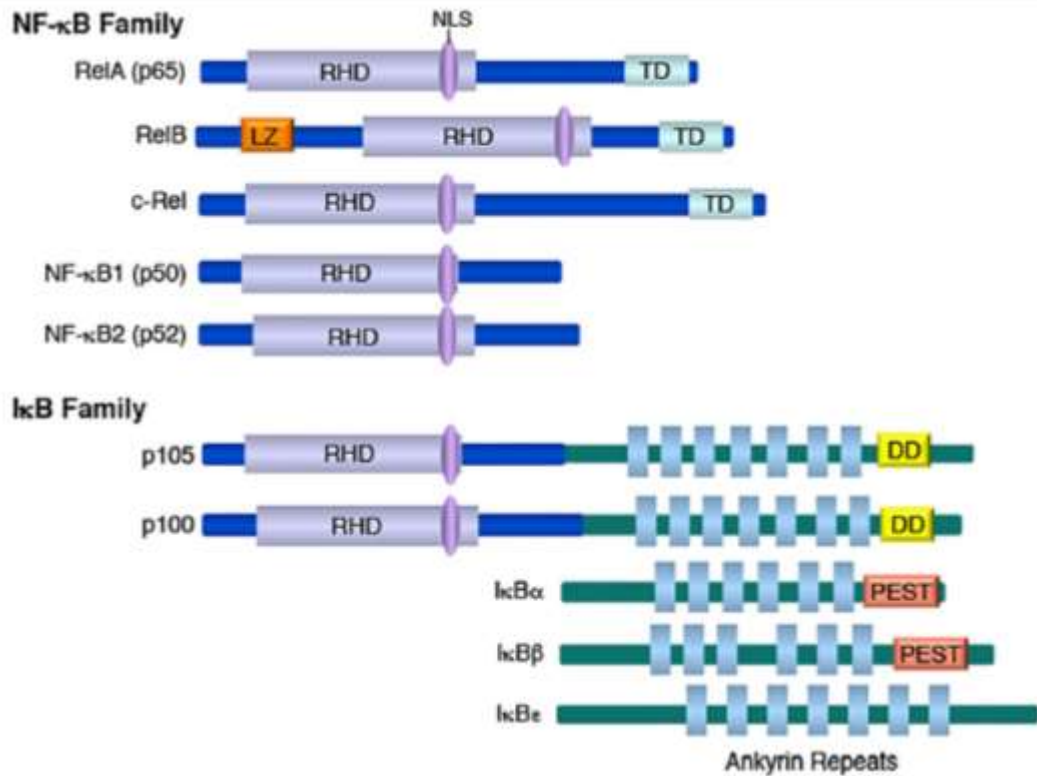


Figura 5. Miembros de la familia NF-κB en mamíferos. En la parte superior se muestran los miembros que conservan el dominio de homología Rel (RHD), mientras que en la parte inferior se encuentran los inhibidores κB que presentan el dominio anquirina. Este último dominio también se encuentra en los precursores p100 y p105, pero se pierde en las formas activas p52 y p50. Entre paréntesis se muestran los nombres alternativos de algunas de estas proteínas. Tomado de Zhang, H. & Shao-Cong, Sun., 2015

La actividad biológica de NF-κB se encuentra regulada principalmente por los inhibidores IκB, los cuales poseen repetidos anquirina. Los miembros de esta familia incluyen a IκBβ, IκBε, y al miembro más caracterizado, IκBα (Figura 4). La localización de los complejos NF-κB-IκB es principalmente citoplasmática, debido a la presencia de una NES en IκBα; no obstante, cuando existe un estímulo apropiado las proteínas IκB se fosforilan y se ubiquitinan en una reacción dependiente de citocinas, lo cual lleva a la degradación de IκB y la posterior liberación y translocación nuclear de NF-κB mediante sus NLS,

regulándose así la expresión de sus múltiples genes blanco (Liu, T. et al., 2017; Huang, T. T. et al., 2001) (Figura 5).

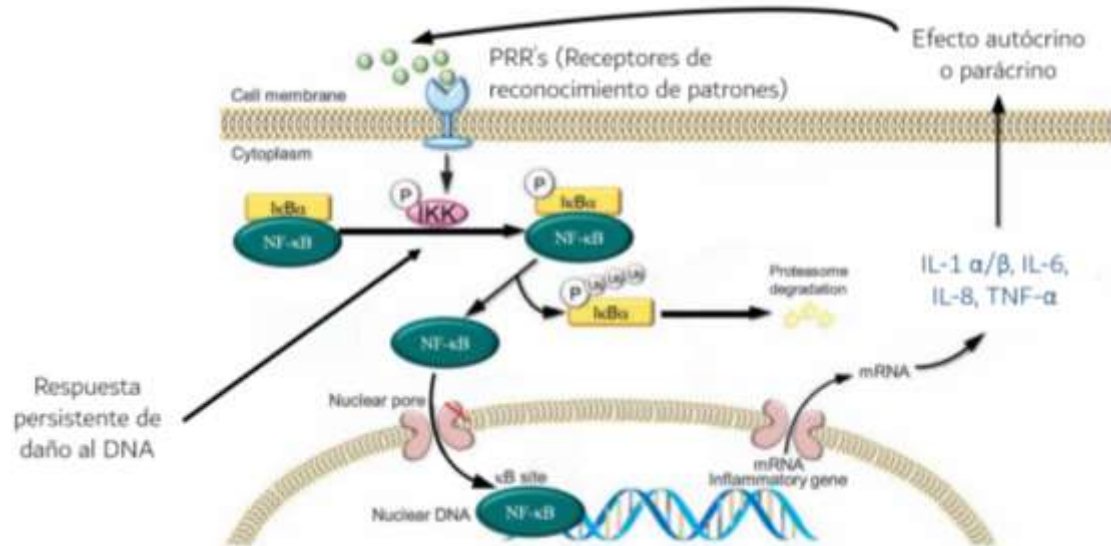


Figura 6. **Regulación de la activación de NF-κB.** Tomada y modificada de Liu, T, et al., 2017.

Los genes diana de NF-κB incluyen genes virales, inmunorreceptores, moléculas de adhesión celular, citocinas, factores de crecimiento y genes que codifican para quimiocinas (incluidos TNF, IL1B, IL2, IL3, IL6, IL8, IL12, CSF2, CCL3, CXCL2, CCL2) proteínas de fase aguda, enzimas oxidativas y proteínas relacionadas con estrés (Magnani, M. et al., 2000). También se ha descrito que NF-κB controla la expresión de genes asociados a la proliferación celular, invasión, angiogénesis, metástasis y cáncer. Se cree que NF-κB es un determinante de la tumorigénesis, ya que regula genes que controlan el ciclo celular, incluyendo las ciclinas D1, D2, D3 y E1, así como a c-myc, CDK2, CDK4 y CDK6 (Fan, Y. et al., 2013).

La gran variedad de inductores de NF-κB incluyen el factor de necrosis tumoral alfa (TNFα), interleucina 1-beta (IL-1b), lipopolisacáridos bacterianos (LPS), la radiación ionizante y especies reactivas de oxígeno (ROS). Su activación requiere la degradación de las proteínas IκB a través de su fosforilación y

degradación mediante proteosoma. Los activadores de NF- κ B principales son los miembros del complejo cinasa I κ B (IKK) que incluyen a IKK α , IKK β e IKK γ . Únicamente la fosforilación en los residuos de serina 32 y 36, seguido de la ubiquitinación de las lisinas 21 y 22 llevan a la degradación de I κ B mediante el proteosoma (Magnani, M. et al., 2000; Bubici, C. et al., 2006; Fan, Y. et al., 2013).

1.3.4 Presencia de SASP en el HGPS

Anteriormente se ha puesto en evidencia la activación de un fenotipo secretor en el HGPS, y se cree que este se encuentra regulado por la vía NF- κ B, debido a que en el modelo progeroide de ratón *Zmpste24^{-/-}* esta proteína se encuentra hiperactivada (Osorio, F. G. et al., 2012), además de que hay una mayor actividad del sitio promotor del gen NFKB en el modelo celular de fibroblastos dérmicos de pacientes con HGPS (Squarzoni, S. et al., 2020). En este modelo también se ha observado un incremento de la secreción de IL-6, al igual que un aumento de su mensajero dado por la mayor actividad de su promotor (Squarzoni, S. et al. 2020). El incremento la expresión de factores del SASP también se ha estudiado en modelos celulares de HGPS del sistema cardiovascular, donde se ha visto que hay una sobreexpresión de genes pro-inflamatorios como IL1B, IL6, ICAM1 y MCP1 en células endoteliales y células musculares lisas vasculares diferenciadas de células iPS de HGPS (Xu, Q. et al., 2022).

La activación de este fenotipo se relaciona con la presencia de progerina en el HGPS, debido a que se ha demostrado que la sobreexpresión de progerina en células endoteliales de arteria coronaria humana (HCAEs) incrementa la expresión y secreción de las citocinas pro-inflamatorias IL-6 e IL- β , las quimiocinas CXCL8, CCL2 y las moléculas de adhesión ICAM1 y VCAM1. Además, el incremento de estas últimas se relaciona con el reclutamiento de macrófagos en la placa aterosclerótica en pacientes con HGPS (Bidault, G. et al., 2020).

1.4 Trafico nuclear de proteínas

El núcleo se encuentra limitado por la envoltura nuclear y de esta manera se resguarda el ADN de las células eucariotas y se asegura un estricto control de los procesos nucleares y del intercambio de componentes entre el núcleo y el citoplasma (Ossareh-Nazari, B. et al., 2001). El tráfico de macromoléculas ocurre a través de los complejos del poro nuclear (NPCs) que se encuentran embebidos entre la membrana nuclear interna y externa. Las moléculas pequeñas (20-40 kDa) pueden difundir pasivamente a través de los NPCs, mientras que las moléculas más grandes que 40 kDa son transportadas mediante mecanismos dependientes de energía (Nguyen, K. T. et al., 2012; Hutten, S. et al., 2007). Tanto la importación como la exportación nuclear de las proteínas de gran tamaño, las subunidades ribosomales y algunos ARNs son mediados por una familia de factores ampliamente conservados a través de la evolución, las karioferinas- β . Las importinas y exportinas son las principales subfamilias de las karioferinas. Se han identificado 10 importinas y siete exportinas diferentes; cuatro importinas y la exportina CRM1 funcionan a través del reconocimiento de señales específicas que reconocen sobre las proteínas blanco, las señales de localización nuclear (NLSs) y señales de exportación nuclear (NES) respectivamente (Pemberton, L. F. et al., 2005; Azmi, A. S. et al., 2020). Una NLS clásica está compuesta por una secuencia corta de aminoácidos, mientras que la NES consiste en un segmento corto de residuos o de aminoácidos hidrofóbicos (mayoritariamente leucinas). El receptor de la exportación nuclear CRM1 interactúa de forma específica con la NES (Nguyen, K. T. et al., 2012).

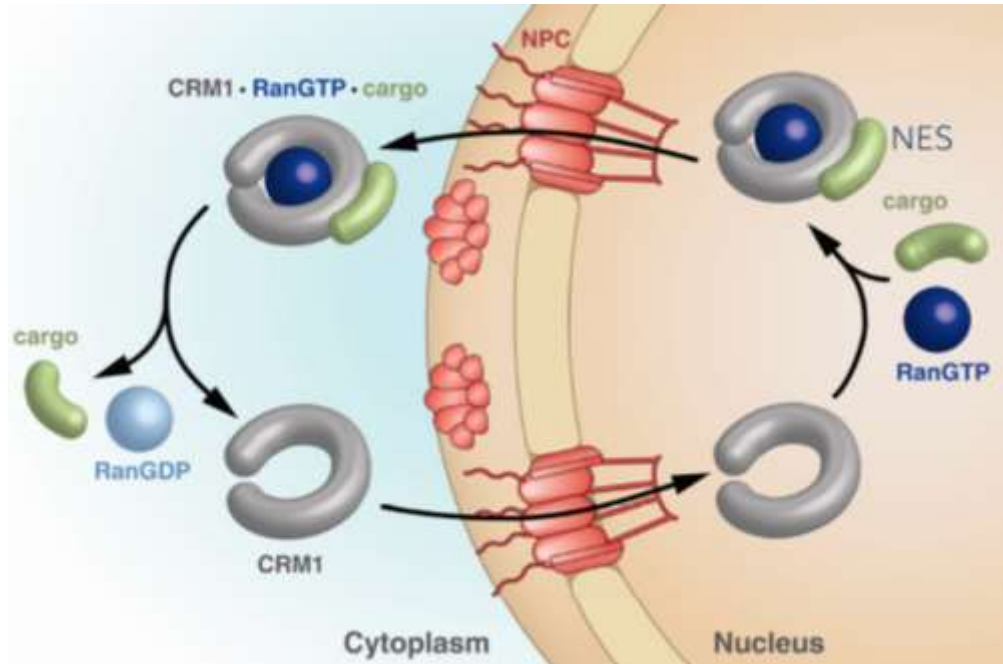


Figura 7. Mecanismo de exportación nuclear mediado por CRM1. Tomado y modificado de Dickmanns, A. et al., 2015.

El ensamblaje de los complejos cargo-exportina esta orquestado por la GTPasa Ran. Como otros miembros de la superfamilia de las GTPasas, Ran puede estar conjugado con GDP o GTP. La conversión entre las dos formas de Ran es controlada por el factor de intercambio de guanina llamado RanGEF (RCC1), el cual se ubica en el núcleo, y por la proteína activadora de GTPasa llamada RanGAP, el cual se localiza en el citoplasma. De forma similar, los cofactores de la activación de RanGAP, RanBP2 y RanBP1, se localizan en el NPC y en el citoplasma, respectivamente. Esta distribución asimétrica de las proteínas reguladoras de Ran proporcionan un gradiente donde RanGDP predomina en el citoplasma y RanGTP se concentra en el núcleo, asegurando así la direccionalidad del transporte nuclear (Ossareh-Nazari, B. et al., 2001). La formación del complejo de exportación trimérico compuesto por CRM1, RanGTP y la proteína cargo, ocurre a través de la interacción cooperativa entre los tres componentes (Figura 6) (Nguyen, K. T. et al., 2012).

1.4.1 La exportina CRM1

CRM1, también conocida como exportina 1 o XPO1, es el mayor receptor de exportación nuclear. Fue identificado por primera vez en la levadura *Schizosacchamocyces pombe*, donde se observó que una mutación en el gen que la codifica originaba una morfología cromosómica anormal. Posteriormente se identificó que CRM1 funciona como receptor de exportación nuclear, y que actúa sobre un gran número de proteínas que portan NES. Tanto CRM1 como la exportina 7 se caracterizan por tener un rango amplio de sustratos (Dickmans, A. et al., 2015; Hutten, S. et al., 2007). La exportina CRM1 tiene un peso de 115 kD y se localiza preferencialmente en el núcleo y la envoltura nuclear. En humanos, CRM1 interactúa con al menos dos proteínas del NPC, las nucleoporinas CAN (Nup214) y Nup88. La secuencia proteica y la estructura terciaria de CRM1 es homóloga entre humanos y levaduras (Nguyen. K. T. et al., 2012).

La exportina CRM1 dirige la exportación nuclear de diversas proteínas, incluyendo factores de transcripción y factores de traducción. Además, CRM1 lleva a cabo la exportación de ARNs, ARN ribosomal y otras especies de ARN menos abundantes (Hutten, S. et al., 2007).

1.4.2 Inhibición de CRM1

La inhibición farmacológica de CRM1 fue investigada originalmente mediante el uso de antibióticos como leptomicina B, anguinomicinas y ratjadona. Sin embargo, estos compuestos se reemplazaron por otros inhibidores de origen natural como gionotalamina, valtrato o curcumina, y recientemente por inhibidores sintéticos y selectivos para CRM1, que incluyen a selinexor, eltanexor, verdinexor y felezonexor (Azmi, A. S. et al., 2020).

El primer inhibidor de CRM1, la leptomicina B, fue descubierto en 1990. Este antibiótico se une covalentemente a la cisteína 528 (Cys528) de CRM1. Este compuesto se utilizó en pruebas clínicas de fase 1 en pacientes con cáncer; sin embargo, las pruebas se descontinuaron debido a su alta toxicidad. Dicha

toxicidad se atribuye a la larga cadena policétida con un anillo de lactona alfa,beta-insaturado que tiene este fármaco (Azmi, A. S. et al., 2020). Debido a lo anterior, se han desarrollado inhibidores sintéticos de la exportación nuclear (SINEs) que presentan una unión reversible con CRM1, lo que contribuye a la reducción de los efectos adversos observados en las pruebas *in vivo* (Dickmans, A. et al., 2015).

Uno de los SINEs más utilizados en los últimos años es el selinexor (KPT-330), debido a que se encuentra aprobado por la FDA para su uso en pacientes con mieloma múltiple que presentan resistencia a otras terapias. En estos pacientes se ha observado una actividad antitumoral significativa (Bader, J. C. 2021; Azmi, A. S. et al., 2020).

2. ANTECEDENTES

En el 2019, García-Aguirre, I. y colaboradores demostraron que la proteína CRM1 y su transcrito se encuentran incrementados en los fibroblastos primarios provenientes de individuos con HGPS, en comparación con un individuo sano (WT). Mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta para CRM1 observaron una señal fluorescente más intensa en las células HGPS (Figura 7A), en comparación con las células WT. Confirmando esta observación, el nivel de CRM1 es mayor en los lisados de los fibroblastos HGPS cuando se analizan mediante western blot (Figura 7B). De manera consistente, el transcrito de CRM1 tiene una expresión mayor en las células HGPS, en comparación con las células WT (Figura 7B). El incremento de CRM1 resulta en una mayor actividad de la exportación nuclear, lo que finalmente deslocaliza del núcleo hacia el citoplasma a las proteínas que son blanco de CRM1, como es el caso de ZO-2 (Figura 7C).

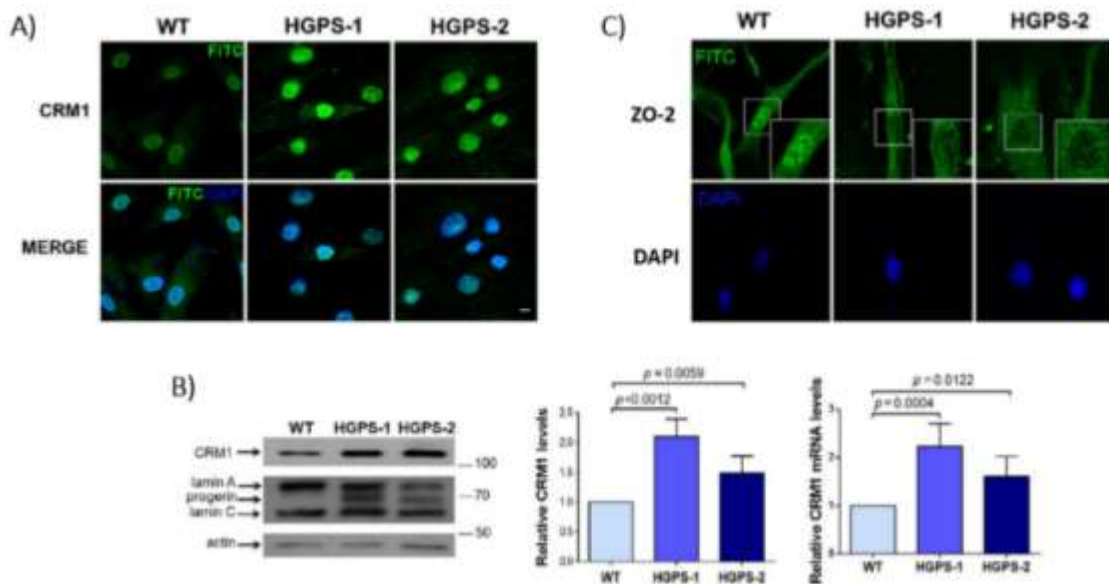


Figura 8. La sobreexpresión de CRM1 en los fibroblastos HGPS ocasiona la deslocalización de proteínas que contienen NES. A) Las células HGPS y WT se immuno-marcaron para CRM1 y se analizaron por microscopio confocal. Se muestran imágenes representativas de 3 ensayos independientes. B) Los lisados de las células WT y HGPS se examinaron mediante Western blot utilizando anticuerpos contra

CRM1, lámina A/C-progerina y actina (control de carga), mientras que la expresión del ARNm de CRM1 se analizó mediante RT-qPCR. C) Las células WT y HGPS se inmuno-tiñeron para ZO-2 y los núcleos se tiñeron con DAPI, previo al análisis por microscopía confocal.

Estos autores propusieron que la exacerbada exportación nuclear de proteínas mediada por CRM1 podría alterar diversos procesos celulares y ser un determinante de la senescencia celular; por lo tanto, decidieron inhibir farmacológicamente a CRM1 utilizando leptomicina B (LMB), con la finalidad de probar si la normalización de la actividad de CRM1 podría contrarrestar la senescencia celular del modelo celular del HGPS. De manera interesante, la inhibición de CRM1 resultó en la recuperación de diversas alteraciones asociadas a senescencia, incluyendo la disminución de la actividad de la enzima β -galactosidasa asociada a senescencia, (Figura 8A), y el aumento del nivel de la lámina B1 y de la histona H3K9me3 (marcador de heterocromatina) (Figura 8B y C). Así mismo, la morfología nuclear aberrante característica de los fibroblastos HGPS se revierte después del tratamiento con LMB (Figura 9D).

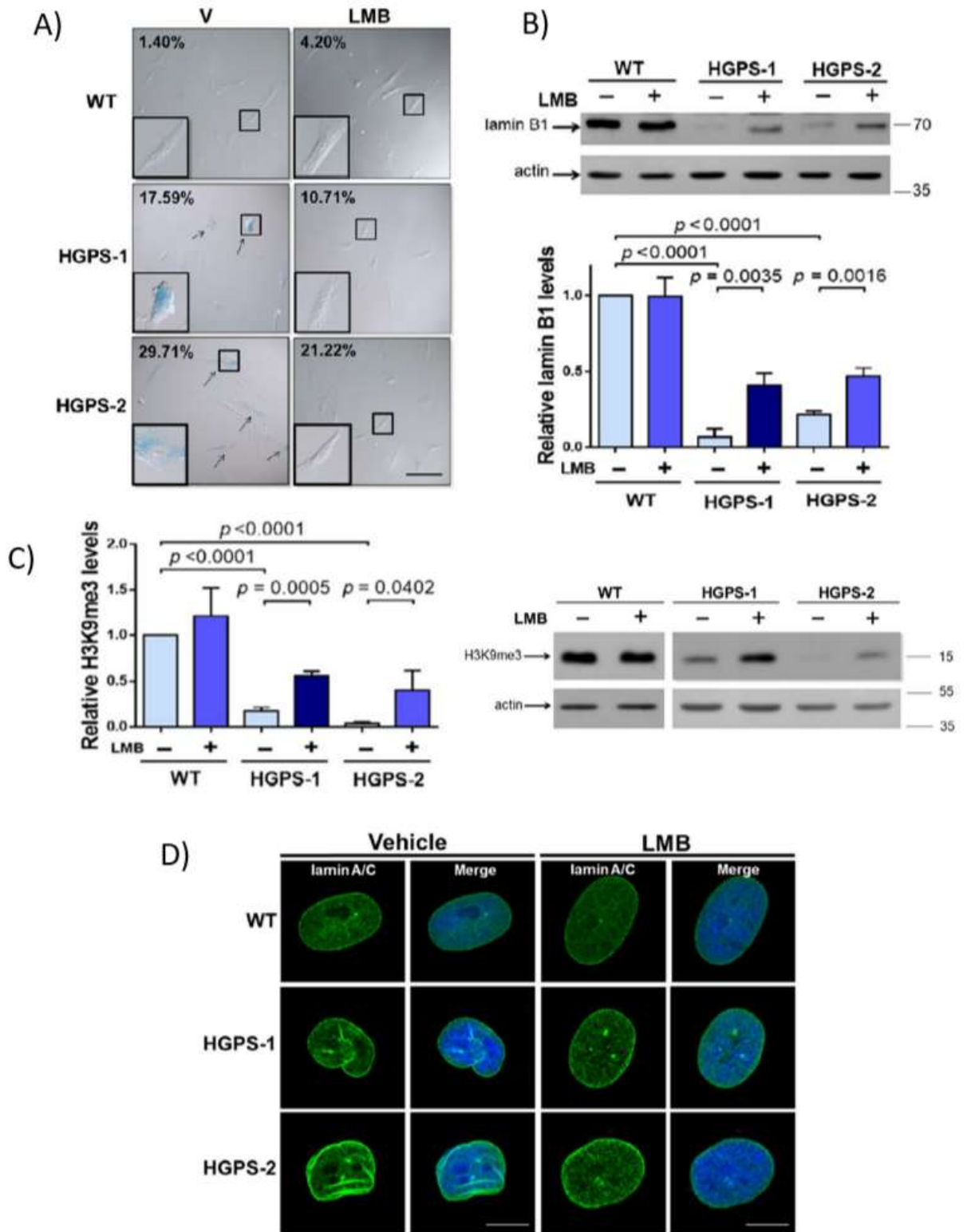


Figura 9. La inhibición de CRM1 previene la senescencia celular mediante el incremento de los niveles de lámina B1. A) Los fibroblastos WT y HGPS se trataron 2 días con 1 nM de LMB o el vehículo solamente. Se evaluó la actividad de β -galactosidasa y se muestran las imágenes representativas. El porcentaje de células senescentes fue calculado a partir de 3 experimentos independientes (n= 300 células por condición). B) Los lisados de los fibroblastos WT y HGPS, previamente tratados durante 6 días con 50 nM de LMB o con el vehículo solamente, se analizaron mediante Western blot usando anticuerpos contra lámina B1 y actina (control de carga). C) Los lisados de las células HGPS se analizaron mediante Western blot utilizando anticuerpos contra H3K9me3 y actina (control de carga). Se muestran los niveles relativos de lámina B1 y H3K9me3 en cada condición experimental. D) Los fibroblastos WT y HGPS fueron tratados por 3 días con 50 nM de LMB o con el vehículo solamente. Las células se marcaron con anticuerpos contra lámina A/C y se analizaron por microscopio confocal láser. Se muestran las imágenes representativas.

3. JUSTIFICACIÓN

En su conjunto, los resultados anteriores posicionan a CRM1 como blanco terapéutico contra el síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford (HGPS), ya que la inhibición de su actividad por medio de fármacos selectivos alivia la senescencia celular; sin embargo, es necesario completar el análisis de los procesos celulares implicados en el establecimiento de la senescencia, como es el caso del fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP). Por lo tanto, en el presente estudio se propone estudiar el efecto de la inhibición de la función de CRM1 sobre el SASP. La función de CRM1 se inhibirá farmacológicamente mediante la utilización de selinexor, y suprimiendo su expresión mediante el empleo de vectores que expresen shRNAs (short hairpin RNAs) dirigidos contra su ARNm.

4. HIPÓTESIS

La inhibición del funcionamiento de CRM1 aminorará el fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP).

5. OBJETIVOS

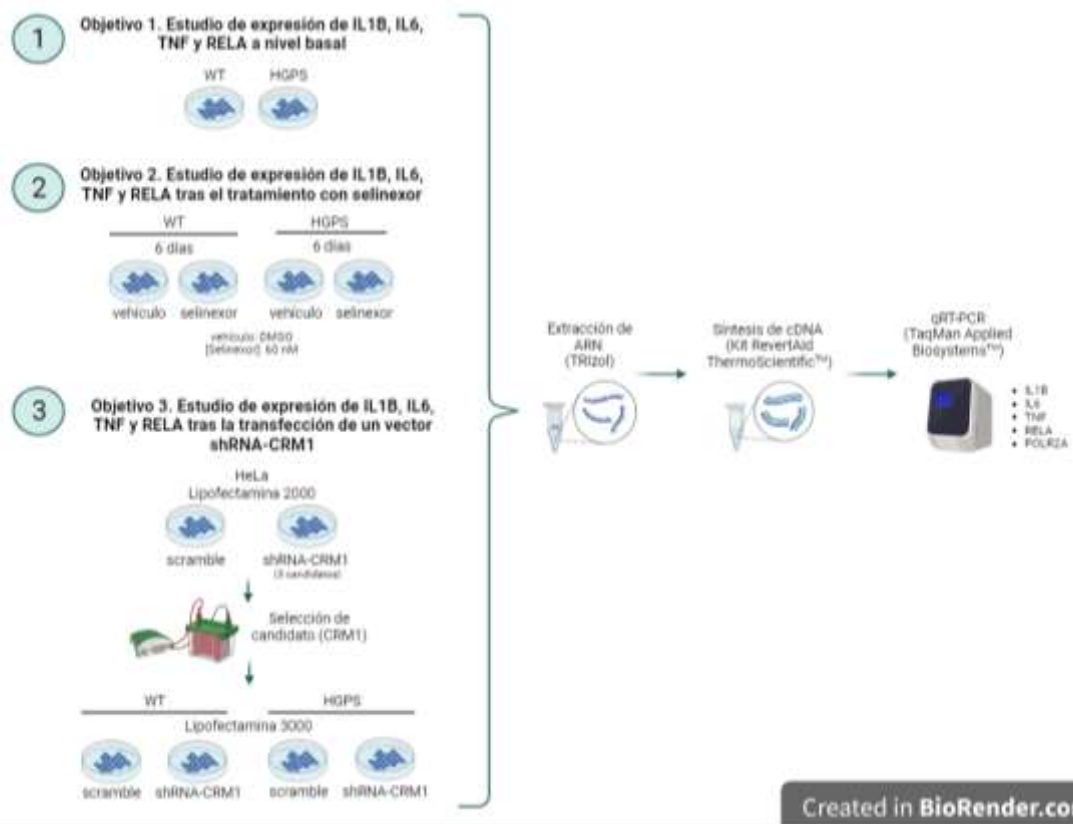
5.1 General:

Analizar el efecto de la inhibición de la función de CRM1 sobre el fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP) en fibroblastos provenientes de pacientes con HGPS.

5.2 Específicos:

1. Evaluar la expresión transcripcional basal de diferentes componentes del SASP en fibroblastos provenientes de pacientes con HGPS y de un individuo sano (control).
2. Evaluar el efecto de la inhibición farmacológica de CRM1 sobre la expresión transcripcional de diferentes componentes del SASP en fibroblastos provenientes de pacientes con HGPS.
3. Inhibir la expresión de CRM1 a través de la utilización de shRNAs específicos contra esta exportina.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL



7. MODELO DE ESTUDIO



CONTROL
GM03440
Fibroblastos de piel
Masculino de 20 años
aparentemente sano



HGPS1
AG11513
Fibroblastos de piel
Paciente de sexo femenino
de 8 años



HGPS2
AG01972
Fibroblastos de piel
Paciente de sexo femenino
de 14 años

8. METODOLOGÍA

7.1 Cultivo celular

Se utilizaron fibroblastos dermales primarios provenientes de un individuo sano (AG08469; Coriell Cell Repository) y de dos pacientes con HGPS (AG11513, AG01972 Coriell Cell Repository). Las células se cultivaron a 37°C con 5% de CO₂ en medio MEM (Sigma Aldrich 56416C) suplementado con aminoácidos no esenciales, solución de Earle's salts (Gibco™), D-glucosa (10 g/l) y rojo fenol (0.11 g/l). El medio se suplementó además con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor y 50 U/ml de penicilina y estreptomicina. Las células HeLa (CCL-2™) se cultivaron a 37°C con 5% de CO₂ en medio DMEM (Sigma Aldrich D0819) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor y 50 U/ml de penicilina y estreptomicina.

7.2 Extracción de ARN

Los cultivos de fibroblastos crecidos a una confluencia del 70-80% se lavaron dos veces con PBS (pH 7.4). Después se removieron mediante raspado celular junto con 300 µl de reactivo TRI® (Sigma Aldrich T9424) para proceder con la lisis. La solución se trasladó a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se añadieron 80 µl de cloroformo; tras una agitación fuerte, la mezcla se dejó incubar durante 5 minutos en hielo y se centrifugó a 13,000 rpm a 4° durante 20 minutos. Después de extraerse la fase acuosa, se añadieron 500 µl de isopropanol frío mezclando suavemente, para dejarse en incubación durante 1 hora a -20°C y centrifugarse después a 13000 rpm a 4° durante 20 minutos. Posteriormente se decantó el isopropanol, se añadieron 400 µl de etanol al 70% y se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 min a 4°C. Finalmente se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en agua. Para evitar contaminación de ADN genómico las muestras se trataron con DNaseI (2000 U, Thermo Scientific™, EN0521) durante 30 minutos a 37°C y la enzima se desactivó a 65°C durante 10 minutos.

7.3 Síntesis de ADN complementario

Para la síntesis de ADNc se utilizó un kit de síntesis de ADNc (RevertAid; Thermo Scientific™, K1622) utilizando las muestras previamente extraídas (ver protocolo *Extracción de ARN*). Se utilizó 1 µg de ARN, 100 µM de Oligo(dT), la solución amortiguadora de reacción 5X (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT), 20 U de inhibidor de RNasa (RiboLock), 20 mM de dNTPs y 200 U de la enzima transcriptasa reversa (RevertAid). La reacción se llevó a cabo durante 60 minutos a 42°C y posteriormente se incubó 5 minutos a 70°C para su inactivación.

7.4 RT-PCR en tiempo real

Para las pruebas de RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR) se utilizó la mezcla maestra de expresión génica TaqMan® 2X (ThermoFisher Scientific™, 4369016) en conjunto con sondas para ensayos de expresión génica FAM/VIC TaqMan® 20X (Applied Biosystems, 4448892/4448508) para los genes POLR2A, IL1B, IL6, TNF y RELA, agua libre de nucleasas (ThermoFisher Scientific™) y el templado de cDNA (50 nM) (ver protocolo *Síntesis de ADN complementario*). Se utilizó el sistema de PCR en tiempo real PikoReal™ de Thermo Scientific™ donde se realizaron un total de 40 ciclos por cada reacción.

7.5 Bacterias competentes

Las bacterias de la cepa *Escherichia coli* Top10 se crecieron en medio LB durante toda la noche. Una alícuota de 200 µl fue sembrada en 20 ml de medio LB y se dejó crecer hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 a 630 nm. Las bacterias fueron centrifugadas a 8000 rpm por 5 minutos y la pastilla fue resuspendida en 10 ml de la solución TBF1 pH 5.8 (RbCl 100 mM, MnCl₂•4H₂O 50 mM, CH₃CO₂K 30 mM pH 7.5, CaCl₂•2H₂O 10 mM, glicerol 15% p/v) e incubada en hielo por 20 minutos. Se centrifugó nuevamente la muestra bajo las mismas condiciones y la pastilla se resuspendió en 2 ml de la solución

TBF2 (MOPS 10 mM pH 6.8, RbCl 10 mM, CaCl₂•2H₂O 75 mM, glicerol 15% p/v) y se incubó en hielo por 20 minutos para finalmente ser almacenada a -70°C.

7.6 Transformación bacteriana

Para transformar las bacterias competentes de la cepa *E. coli* Top10 (ver protocolo *Bacterias competentes*) se agregó 1 µl del vector correspondiente al cultivo bacteriano y la mezcla se incubó en frío durante 30 minutos para posteriormente someterla a choque térmico a 42°C durante 1.5 minutos. Posteriormente, las bacterias se dejaron en crecimiento en medio LB durante 1 hora a 37°C y se sembraron en placas de medio LB sólido con ampicilina. Pasadas 12 horas se verificó el crecimiento bacteriano.

7.7 Extracción de ADN plasmídico

7.7.1 Miniprep casera

Se tomó una colonia aislada de las bacterias transformadas (ver protocolo *Transformación bacteriana*) para inocular 5 ml de medio LB. El cultivo se propagó durante toda la noche y posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm por 1 minuto y la pastilla se resuspendió en 100 µl de la solución 1 enfriada previamente (50 mM glucosa, 25 mL TrisHCl (pH 8), 10 mM EDTA (pH 8)) y se agitó suavemente. Después de un reposo de 5 minutos se agregaron 200 µl de la solución 2 en frío (0.2 N NaOH, 1% SDS). Se agitó la mezcla por inversión y se dejó incubando por 10 minutos en frío, y pasado este tiempo se agregaron 150 µl de la solución 3 en frío (5M CH₃CO₂K, 3M CH₃COOH), se agitó nuevamente la solución y se dejó incubando por 10 minutos en hielo. Una vez formado el precipitado blanco se centrifugó a 12,000 rpm por 20 minutos y la pastilla se resuspendió en 500 µl de etanol al 70% frío. Finalmente se centrifugó a 12,000 rpm por 5 minutos y se retiró el sobrenadante para permitir el secado de la pastilla al vacío y su resuspensión en 90 µl de agua MilliQ®.

7.7.2 Midiprep

Se siguieron las instrucciones del protocolo del kit de purificación de ADN plasmídico PureLink™ Hi Pure utilizando una colonia aislada de las bacterias transformadas (ver protocolo *Transformación bacteriana*).

7.8 Transfección

Células HeLa a una confluencia de 70% fueron transfectadas con los vectores shRNA-CRM1 utilizando el reactivo Lipofectamine® 2000 (Invitrogen™, 11668-019). Para ello, se colocaron en un tubo estéril 4µl de Lipofectamine® 2000 junto con 50 µl de medio Opti-MEM (Gibco™). Por otro lado, se combinaron 100 µl de medio Opti-MEM con 1.5 µg del vector correspondiente (Cat# CSHCTR001-1-nH1, HSH018561-31-mH1 HSH018561-32-mH1, HSH018561-33-mH1, Genecopoeia™). Después de mezclar el contenido de ambos tubos se dejó en incubación durante 20 minutos. Finalmente, el complejo fue añadido sobre las células previamente cambiadas con una mezcla de medio DMEM+Opti-MEM (en relación 1:1), mezclando suavemente y dejando en incubación a 37°C con 5% de CO₂. 48 horas post-transfección las células fueron incubadas con medio suplementado con puromicina a 0.5 µg/ml (a partir del stock de Dihidrocloruro de puromicina, 10 mg/ml, Gibco® A1113803). A los 9 días post-transfección se cambió el medio a una dosis de mantenimiento de 0.25 µg/ml.

7.9 Extracción de proteínas totales

Se crecieron las células previamente transfectadas (ver protocolo *Transfección*) y mantenidas en medio DMEM. A una confluencia del 70-80%, las células se lavaron dos veces con PBS pH 7.4 y se removieron de la caja petri mediante raspado celular. Las células se transfirieron a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se centrifugaron a 8,000 g durante 5 minutos y se colocaron en hielo escarcha. Posteriormente se adicionaron 90 µl de una solución de lisis 1x (50mM Tris-HCl pH 8; 150 mM NaCl, 1% Tritón, 0.1% SDS,

0.5% desoxicolato de sodio, 1mM PMSF, cOmplete™ 7x (Roche 11836153001)) e inmediatamente la suspensión se sometió a sonicación (Soniprep 150) durante tres ciclos de 15 segundos a 3.5 micrones, con un espacio de tiempo de 30 segundos. La mezcla se mantuvo en hielo todo el tiempo y enseguida se centrifugó a 10,000 RPM durante 5 min a 4°C para remover los restos celulares, y se recuperó el sobrenadante (extracto de proteínas totales).

7.10 Inmunodetección en fase sólida

Una alícuota de los lisados (70 µg de proteína) se sometió a electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 10%, empleando la solución de corrimiento, (25 mM Tris, 250 mM Glicina pH 8.3, 0.1% SDS), y posteriormente las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Hybond-N+, Amersham Pharmacia) utilizando el dispositivo Trans-blot (Bio-Rad) y una corriente de 20 voltios, durante 1 h en la solución de transferencia (39 mM Glicina, 48 mM Tris base, 0.037% SDS, 20% Metanol). Posteriormente las membranas fueron bloqueadas con la solución TBST 1X (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5% (v/v), Tween-20) y 10% (w/v) de leche en polvo baja en grasa) durante 1 h a temperatura ambiente en agitación constante. Posteriormente, la membrana fue incubada en agitación constante durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario adecuado diluido en TBST 1X. Después de tres lavados de 10 min cada uno con TBST 1X, la membrana fue incubada durante 1 h a temperatura ambiente en agitación constante con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa de rábano. La señal se reveló mediante el sistema de análisis de Western blot ECL (C-DiGit® Blot Scanner, LI-COR, Inc).

7.11 Anticuerpos

Para los ensayos de inmunodetección en fase sólida se emplearon los siguientes anticuerpos: anticuerpo de conejo anti-CRM1 (NOVUS NB100-79802; dilución 1:4000), anticuerpo anti-beta actina (dilución 1:5000), donación del Dr. Manuel Hernández del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV).

8. RESULTADOS

8.1 Los fibroblastos de pacientes con HGPS presentan un aumento de la expresión del transcrito del gen IL1B

Para comprobar si existen cambios en la expresión transcripcional de los componentes del SASP en los fibroblastos HGPS, se evaluaron los niveles de RNAm de los genes IL1B, IL6, TNF y RELA mediante RT-qPCR, examinando cultivos provenientes de dos diferentes pacientes con HGPS (HGPS1 y HGPS2) y un cultivo de fibroblastos de un individuo sano como control (WT). En estudios previos se ha observado una sobreexpresión de los genes IL1B, IL6, ICAM1 y MCP1 en diferentes modelos del HGPS (Squarzoni, S. et al., 2020, Osorio, F. G. et al., 2012; Xu, Q. et al., 2022), por lo que hipotetizamos que estos resultados se reproducirían en nuestros cultivos. Sin embargo, no observamos diferencias significativas en la expresión de los genes IL6, TNF y RELA en los fibroblastos HGPS, mientras que solo encontramos un incremento en la expresión transcripcional de IL1B en las células HGPS1.

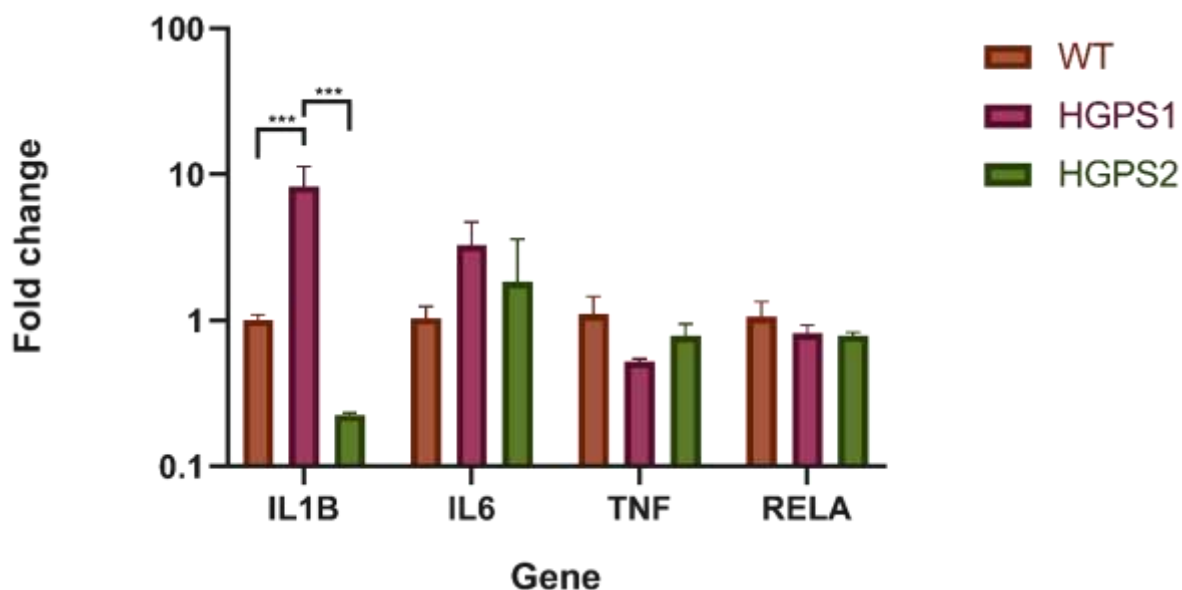


Figura 10. Expresión transcripcional de los genes IL1B, IL6, TNF y RELA en los fibroblastos HGPS. Se extrajo RNA total de los cultivos de fibroblastos provenientes de un individuo sano (WT) y de dos pacientes con HGPS (HGPS1 y HGPS2). Posteriormente se analizó la expresión del ARNm de los genes mencionados

mediante RT-PCR. Se utilizó el método $\Delta\Delta CT$ para el análisis cuantitativo y el gen POLR2A como control de expresión constitutiva. La gráfica muestra los promedios de tres repetidos independientes para las muestras WT y HGPS1 y dos repetidos independientes para HGPS2. Las barras representan la media con el error estándar para cada grupo. Las diferencias significativas se determinaron mediante la prueba ANOVA de dos vías.

8.2 El tratamiento con selinexor disminuye la expresión de diferentes componentes del SASP en los fibroblastos HGPS

Con el objetivo de analizar si la inhibición farmacológica de CRM1 con selinexor tiene un efecto sobre la regulación transcripcional del SASP en los fibroblastos HGPS, se analizaron los niveles de ARNm de los genes IL1B, IL6, TNF y RELA mediante RT-qPCR (RELA (p65) forma parte de la familia NF- κ B) (Figura 2A). En un estudio anterior se descubrió que el fármaco selinexor tiene efectos antiinflamatorios (Kashyap, T, et al., 2021), debido a que al inhibir el sitio activo de CRM1 se produce una acumulación nuclear de I κ B (porque contiene una NES) y reduce su fosforilación, previniendo su degradación a través del proteosoma y llevando a la atenuación de la actividad de NF- κ B (Kashyap, T, et al., 2016). Encontramos que el tratamiento con selinexor durante 6 días reduce significativamente los niveles de ARNm de los genes IL1B, IL6 y TNF y RELA (p65) en los fibroblastos HGPS, siendo estos genes blanco de NF- κ B (Figura 2A). De forma interesante, las células WT reaccionaron de forma diferente al selinexor, se incrementó la expresión de los genes IL1B y RELA pero no alteró la expresión de IL6 y TNF (Figura 2B), lo que sugiere que el efecto antiinflamatorio del selinexor se manifiesta específicamente en los fibroblastos HGPS.

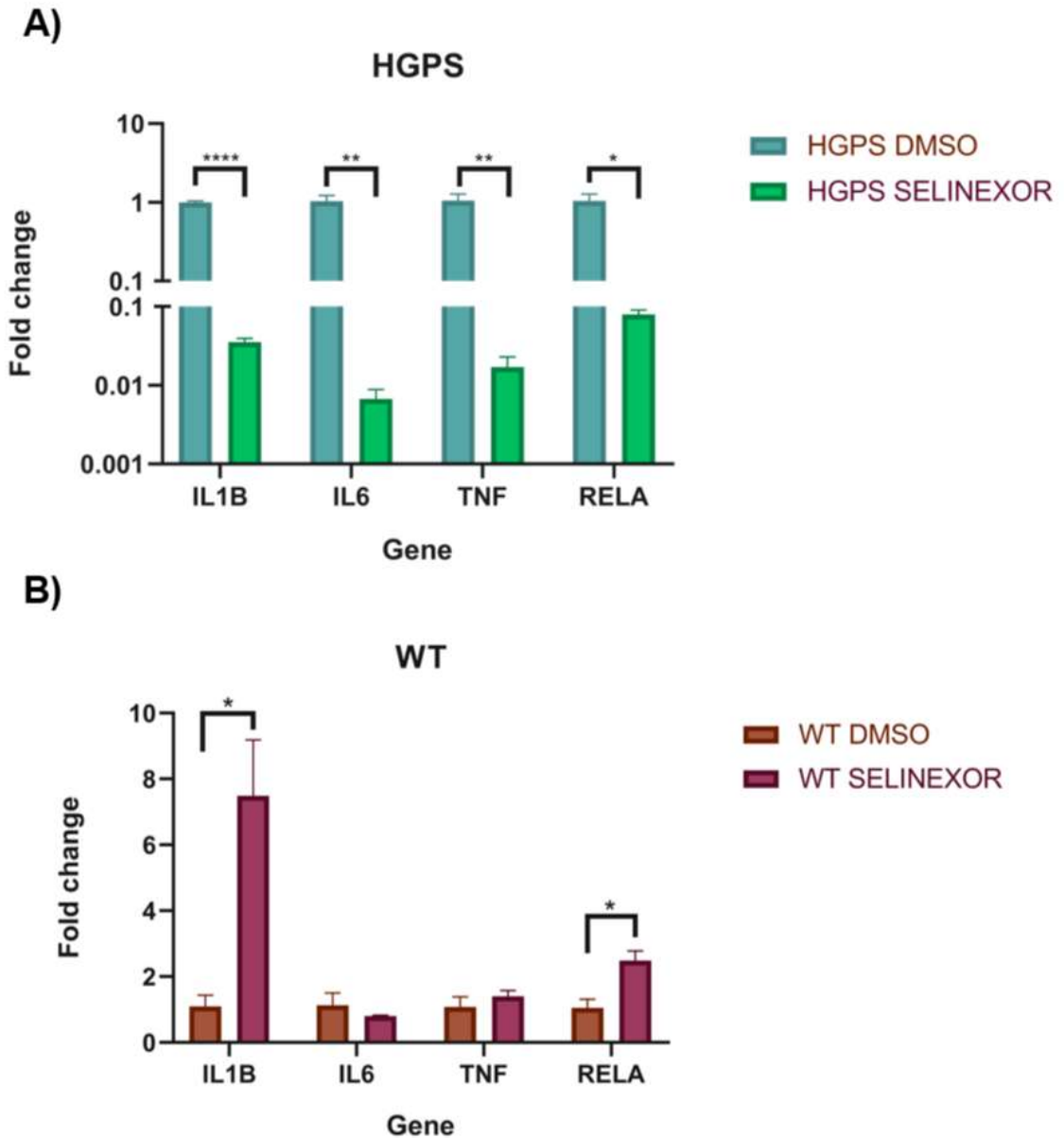


Figura 11. Efecto del selinexor sobre la expresión de los genes IL1B, IL6, TNF y RELA en los fibroblastos HGPS. (A y B) Se extrajo RNA total de las células WT y HGPS1 y posteriormente se llevaron a cabo ensayos de qRT-PCR para medir la expresión de los componentes de los componentes del SASP señalados en la Figura. Se utilizó el método $\Delta\Delta CT$ para el análisis de los transcritos usando el gen POLR2A como control constitutivo. La gráfica muestra los promedios de tres repeticiones biológicas y las barras representan la media \pm el error estándar para cada grupo experimental. Las diferencias significativas se determinaron mediante la prueba t no pareada.

8.3 Silenciamiento de la expresión de CRM1 en las células HeLa empleando vectores que expresan shRNAs

Considerando que la inhibición farmacológica de CRM1 tiene un efecto anti-senescente en los fibroblastos HGPS, decidimos utilizar una estrategia alternativa para fortalecer la hipótesis de que CRM1 es un determinante importante para el HGPS, que consistió en silenciar la expresión de CRM1 utilizando la tecnología del ARN interferente. Con esta finalidad, se adquirieron vectores que codifican para tres diferentes shRNA dirigidos contra el ARNm de CRM1 (GeneCopoeia™) y para un shRNA irrelevante (control negativo). Para probar la eficacia de cada shRNA y elegir el vector que provocara una mayor inhibición del transcrito de CRM1 utilizamos las células HeLa, ya que esta línea celular se transfecta más eficientemente que los fibroblastos primarios. Para obtener células transfectadas establemente, los cultivos transfectados con lipofectamina se mantuvieron en medio DMEM suplementado con 0.5 µg/ml de puromicina (Figura 12A). Las células transfectadas se monitorearon mediante microscopia de fluorescencia para verificar la coloración roja derivada de la expresión del gen reportero mCherry (Figura 12B). Una vez enriquecidos los cultivos transfectados se obtuvieron los lisados de proteínas para medir los niveles relativos de CRM1 mediante ensayos de inmunodetección en fase sólida, utilizando la detección de actina como control de carga. En la Figura 12C se observa que los shRNA 2 y 3 provocan una disminución discreta per significativa del nivel de CRM1 (30-40%), en comparación con el vector control (Scramble) (Figura 3C).

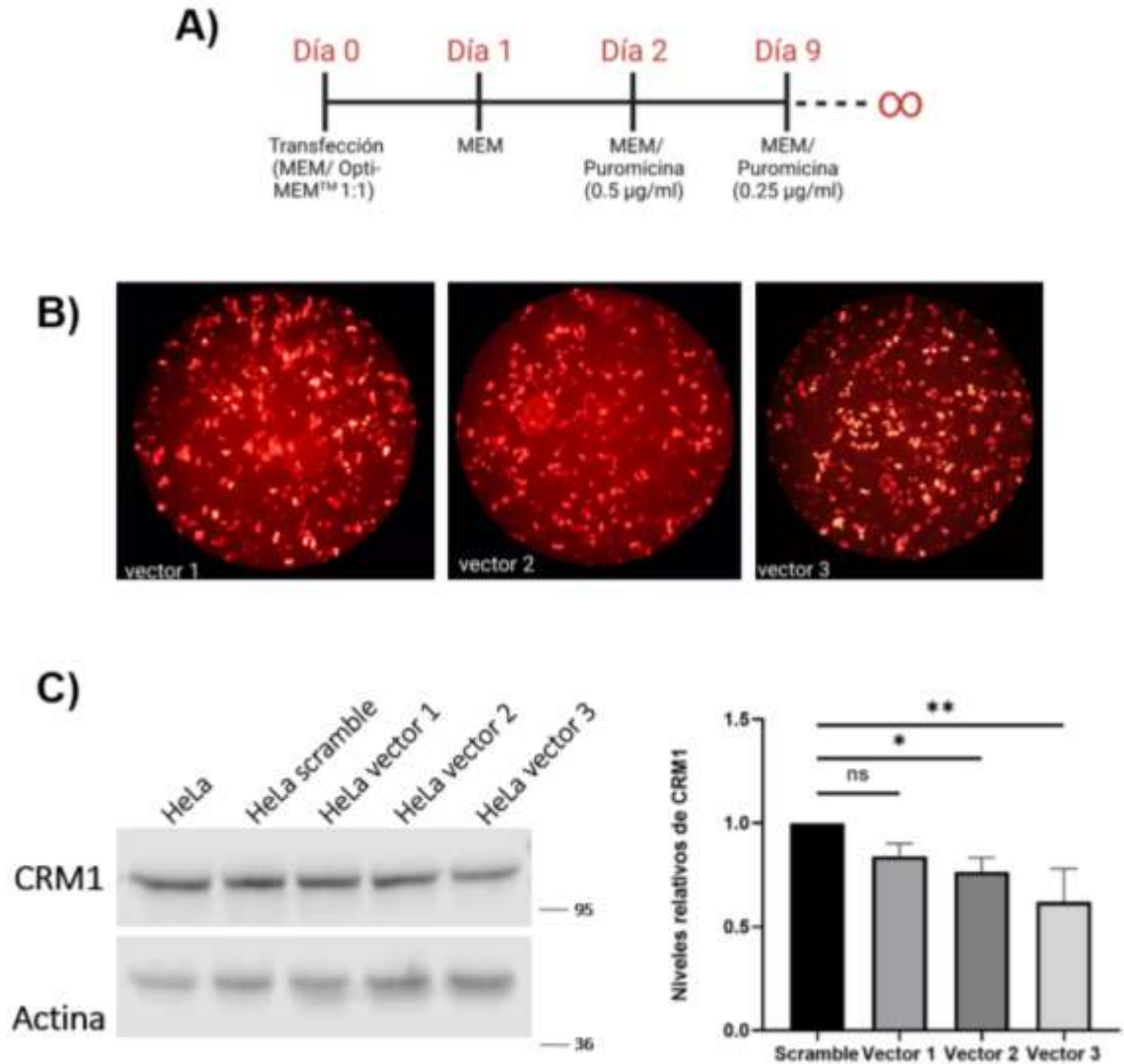


Figura 12. Silenciamiento de la expresión de CRM1 en las células HeLa mediante la utilización de shRNAs. (A) Esquema experimental para la selección de células transfectadas establemente. (B) Expresión de la proteína reportera mCherry (rojo) en las células HeLa a las 24 h post-transfección. Las células se visualizaron mediante microscopía de fluorescencia. (C) Análisis del nivel de CRM1 en las células HeLa transfectadas establemente con los diferentes shRNAs. Los lisados obtenidos de los diferentes cultivos se analizaron mediante inmunodetección en fase sólida utilizando anticuerpos primarios contra CRM1 y actina (control de carga.). La gráfica de la derecha muestra los niveles relativos de CRM1 de tres ensayos independientes, y el análisis estadístico se realizó mediante la prueba de t no pareada.

9. DISCUSIÓN

La senescencia celular se define como el arresto irreversible del ciclo celular, fenómeno que es acompañado por una desregulación general del metabolismo (Cristofalo, V. J. et al., 2004). Esta alteración ocasiona el fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP), caracterizado por un incremento en la producción y secreción de interleucinas, citocinas inflamatorias, factores de crecimiento, proteasas y proteínas de matriz extracelular (Kuilman, T. et al., 2010; En, A. et al., 2020). Este fenotipo se encuentra regulado a diferentes niveles incluyendo la remodelación de la cromatina, la transcripción, la traducción, el tráfico intracelular y la secreción, y el perfil de sus componentes depende del tipo de inductor (Han, X., et al, 2022; Ogrodnik, M. 2021). A nivel transcripcional, el principal regulador es la familia de factores de transcripción NF- κ B, los cuales forman homo- y hetero-dímeros, siendo el heterodímero RelA-p50 el más abundante (Fan, Y. et al., 2013; Bubici, C. et al., 2006).

En el HGPS, se ha descrito que la presencia de progerina induce la expresión de genes proinflamatorios asociados al SASP (IL1B, IL6, ICAM1 y MCP1) al incrementar la actividad de NF- κ B, fenómeno que culmina con la secreción de estas proteínas (Squarzoni, S. et al., 2020; Bidault, G. et al., 2020). Debido a que el SASP es una característica distintiva de las células senescentes, la evaluación de los fármacos anti-senescentes o senolíticos debe incluir el análisis de este fenotipo. A este respecto, nuestro grupo de trabajo describió previamente que el selinexor y la leptomicina B (inhibidores selectivos de CRM1) mitigan diferentes marcas de senescencia células en los fibroblastos HGPS, incluyendo la morfología nuclear aberrante, la morfología celular senescente, la expansión nucleolar y la pérdida de heterocromatina (García-Aguirre, I. et al., 2019; Soto-Ponce, A., resultados no publicados). Por lo tanto, en el presente estudio decidimos evaluar el efecto del selinexor sobre la expresión transcripcional de diferentes componentes del SASP en los fibroblastos HGPS.

Después de tratar a los fibroblastos HGPS durante 6 días con selinexor, observamos un aumento del ARNm del gen IL1B, mientras que los genes proinflamatorios IL6 y TNF no mostraron cambios en su expresión, a pesar de son blancos de NF- κ B (Figura 10). Es importante mencionar que existe la posibilidad de que la producción y secreción de estas citocinas si se encuentre incrementado en los fibroblastos HGPS, a pesar de que su expresión transcripcional se mantuvo estable: por lo que es necesario complementar el presente estudio midiendo el nivel proteico de los componentes del SASP mediante ensayos tipo ELISA. De la misma manera, identificamos que el gen RELA (perteneciente a la familia de factores de transcripción NF- κ B), tampoco presenta un aumento de su ARNm en los fibroblastos HGPS. Se requieren estudios posteriores para dilucidar la regulación del SASP a través de NF- κ B.

Por lo que respecta a la respuesta de los fibroblastos HGPS al tratamiento con selinexor, la producción de los transcritos correspondientes a los genes proinflamatorios IL1B, IL6, TNF y RELA se reprimió significativamente en comparación con los fibroblastos HGPS tratados con el vehículo solamente. (Figura 11A). Debido a que la pérdida de heterocromatina y la activación del SASP están ligados funcionalmente, estos resultados pueden asociarse con la recuperación de la heterocromatina que se observa en los fibroblastos HGPS incubados con selinexor (Soto-Ponce, A., resultados no publicados); de hecho, el receptor de la lámina (LBR) actúa como anclaje sobre los promotores de IL-6, IL-8 y MMP-1 para regular su expresión (En, A. et al., 2020). En su conjunto, estos resultados indican que el selinexor tiene una actividad anti-senescente al atenuar el SASP. Esta noción se sustenta también por los resultados previos que mostraron que el selinexor mitiga diferentes marcas de senescencia (Soto-Ponce, A., resultados no publicados). Finalmente es interesante mencionar que el selinexor presentó una actividad selectiva sobre los fibroblastos HGPS, ya que el tratamiento de los fibroblastos WT tuvo un efecto opuesto sobre la expresión de los componentes del SASP (Figura 11B).

Durante el proceso del presente estudio, decidimos evaluar si la inhibición transcripcional de CRM1 genera resultados similares sobre la senescencia celular, en comparación a su inhibición farmacológica. Con este fin en mente, utilizamos vectores que expresan diferentes shRNAs contra el ARNm de CRM1. Como un primer paso para definir el shRNA con el mayor efecto sobre CRM1 procedimos a transfectar establemente las células HeLa con cada vector por separado. Se determinó que dos de los tres vectores utilizados disminuyeron de forma moderada pero significativa los niveles proteicos de CRM1 (30-40%). Consideramos que la disminución de CRM1 obtenida no es suficiente para evaluar su efecto sobre el fenotipo senescente del HGPS, por lo que es necesario considerar estrategias alternativas para abordar este objetivo. Por ejemplo, el diseño de otra serie de shRNAs y la utilización de vectores virales para infectar los fibroblastos HGPS y expresar eficientemente los shRNAs.

10.CONCLUSIONES

La inhibición farmacológica de CRM1 con selinexor disminuye los niveles del ARNm de los componentes del SASP (IL1B, IL6, TNF y RELA) en los fibroblastos HGPS.

11. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Evaluar los niveles de ARNm de una mayor variedad de componentes del SASP en los fibroblastos HGPS, incluyendo quimiocinas, interleucinas antiinflamatorias y proteasas de matriz extracelular, con la finalidad de definir el efecto del selinexor sobre un perfil completo del SASP.
- Estudiar los componentes del SASP y el efecto que tiene el selinexor sobre ellos mediante pruebas de ELISA.
- Definir una nueva estrategia para inhibición la expresión de CRM1 con shRNAs, y analizar posteriormente el efecto de su silenciamiento sobre el SASP.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Ashapkin, V. V., Kutueva, L. I., Kurchashova, Y. & Kireev, I. I. (2019). Are there common mechanisms between the Hutchinson-Gilford progeria syndrome and natural aging? *Front. Genet.* 10 (455)
2. Azmi, A. S., H. Uddin, M. & Mohammad, R. M. (2020). The nuclear export protein XPO1- from biology to targeted therapy. *Nat. Rev.*
3. Bader, J. C., Abdul-Razak, A. R., Shacham, S. & Xu, H. (2021). Pharmacokinetics of Selinexor: the first-in-class selective inhibitor of nuclear export. *Clin. Pharmacokinet.* 60: 957-969.
4. Bidault, G., Garcia, M., Capeau, J., Morichon, R., Vigoroux, C. & Véronique Béréziat. (2022). Progerin expression induces inflammation, oxidative stress and senescence in human coronary endothelial cells. *Cells*, 9: 1-16.
5. Birch, J. & Gil, J. (2020). Senescence and the SASP: many therapeutic avenues. *Genes Dev.* 34: 1565-1576.
6. Bubici, C. S., Papa, C. G., Zazzeroni, P. F. & Franzoso, G. (2006). The NF- κ B mediated control of ROS and JNK signaling. *Histol. Histopathol.* 21: 69-80.
7. Chen, J. & Goligorsky, M. S. (2006). Premature senescence of endothelial cells: Methusaleh's dilemma. *A. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 290: H1729-H1739.
8. Cisneros, V. & García-Aguirre, I. (2020). Nuclear protein export pathway in aging therapeutics. *Aging.*
9. Collado, M. & Serrano, M. (2006). The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. *Nature Rev.* 6: 472-476.
10. Cristofalo, V. J., Lorenzini, A., Allen, R. G., Torres, C. & Tresini, M. (2004). Replicative senescence: a critical review. *Mech. Ageing Dev.* 125: 827-848.
11. Dickmans, A., Monecke, T. & Ficner, R. (2015). Structural basis of targeting the exportin CRM1 in cancer. *Cells*, 4: 538-568.
12. Dreesen, O. (2020). Towards delineating the chain of events that cause premature senescence in the accelerated aging syndrome Hutchinson–Gilford progeria (HGPS). *Biochem. Soc. Trans.*, 48: 981–991
13. En, A., Takauji, Y., Ayusawa, D. & Fujii, M. (2020). The role of lamin B receptor in the regulation of senescence-associated secretory phenotype (SASP). *Exp Cell Res.*, 390: 111927.

14. Eriksson, M., Brown, W. T., Gordon, L. B., Glynn, M.W., Singer, J., Scott, L... & Collins, F. S. (2003). Recurrent *de novo* point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature*, 423: 293-298.
15. Fan, Y., Mao, R. & Yang, J. (2013). NF- κ B and STAT3 signaling pathways collaboratively link inflammation to cancer. *Protein Cell*, 4 (3): 176-185.
16. García-Aguirre, I., Alamillo-Iñiesta, A., Rodríguez-Pérez, R., Vélez-Aguilera, G., Amaro-Encarnación, E., Jiménez-Gutiérrez, E... & Cisneros, B. (2019). Enhanced nuclear protein export in premature aging and rescue of the progeria phenotype by modulation of CRM1 activity. *Aging cell*, 8: e13002.
17. García-Aguirre, I., Monterrubio-Ledezma, F., Alamillo-Iñiesta, A., Castro-Obregón, S. & Cisneros, B. (2020). Molecular Basis of Progeroid Diseases. In: Gomez-Verjan., Rivero-Segura, N. (eds) *Clinical Genetics and Genomics of Aging*. Springer, Cham.
18. Gonzalez-Gualda, E., Baker, A. G., Fruk, L. & Muñoz-Espín, D. (2020). A guide to assessing cellular senescence in vitro and in vivo. *FEBS J*, 288: 56-80.
19. Gonzalo, S., Kreienkamp, R. & Askjaer, P. (2016). Hutchinson- Gilford Progeria Syndrome: a premature aging disease caused by LMNA Agein. *Res. Rev.*
20. Han, X., Lei, Q., Xie, J., Liu, H., Li, J., Zhang, X... & Gou, X. (2022). Potential regulators of the senescence-associated secretory phenotype during senescence and aging. *The Journals of Gerontology: Series A, Volume 77, Issue 11, pages 2207-2218.*
21. Hernández-Segura, A., Nehme, J, Demaria, M. (2018). Hallmarks of cellular senescence. *Trends Cell Biol.*
22. Herranz, N. & Gil, J. (2018). Mechanisms and functions of cellular senescence. *J Clin. Invest.*, 128 (4): 1238-1246.
23. Huang, T. T. & Miyamoto, S. (2001). Postrepression activation of NF- κ B requires the amino-terminal nuclear export signal specific to I κ B α . *Cell. Mol. Biol.* 21 (14): 4737-4747.
24. Hutten, S. & Kehlenbach, R. H. (2007). CRM1-mediated nuclear export: to the pore and beyond. *Trends Cell Biol.* 17 (4): 193-201.
25. Kashyap, T., Argueta, C., Aboukameel, A., Unger, T. J., Klebanov, B., Mohammad, R. M... & Landesman, Y. (2016). *Oncotarget*: 78883-78895.

26. Kashyap, T., Murray, J., Walker, C. J., Chang, H., Tamir, S., Hou, B... & Landesman, Y. Selinexor, a novel selective inhibitor of nuclear export, reduces SARS-CoV-2 infection and protects the respiratory system *in vivo*. *Antiviral Res.*, 192: 105115.
27. Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W. J. & Peeper, D. S. (2010). The essence of senescence. *Genes Dev.* 24: 2463-2479.
28. Kumari, R. & Jat, P. (2021). Mechanisms of cellular senescence: cell cycle arrest and senescence associated secretory phenotype. *Cell Dev. Biol.* 9.
29. Liu, T., Zhang, L., Joo, D. & Sun, S. C. (2017). NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target Ther.* 2.
30. Lopes-Paciencia, S., Saint-Germain, E., Rowell, M. C., Fernández-Ruiz, A. Kalegari, P. & Febeyre, G. The senescence-associated secretory phenotype and its regulation. *Cytokine*, 117: 15-22.
31. Magalhaes, J. P. & Passos, J. F. (2018). Stress, cell senescence and organismal ageing. *Mech. Ageing Dev.* 170: 2-9
32. Magnani, M., Crinelli, R., Bianchi, M. & Antonelli, A. (2000). The ubiquitin-dependent proteolytic system and other potential targets for the modulation of nuclear factor- κ B (NF- κ B). *Curr. Drug Targets*, 1: 387-399.
33. Muñoz-Espín, D. & Serrano, M. (2014). Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nature Rev.*, 15: 482-496.
34. Nguyen, K. T., Holloway, M. P. & Altura, R. A. (2012). The CRM1 nuclear export protein in normal development and disease. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 3 (2): 137-151.
35. Ogrodnik, M. (2021). Cellular aging beyond cellular senescence: markers of senescence prior to cell cycle arrest *in vitro* and *in vivo*. *Aging cell*, 20.
36. Osorio, F. G., Bárcena, C., Soria-Valles, C., Ramsay, A. J., de Carlos, F., Cobo, J... & López-Otín, C. Nuclear lamina defects cause ATM-dependent NF- κ B activation and link accelerated aging to a systemic inflammatory response. *Genes Dev.*, 26: 2311-2324.
37. Ossareh-Nazari, B., Gwizdek, C. & Dargemont, C. (2001). Protein export from the nucleus. *Traffic*, 2: 684-689.
38. Pemberton, L. F. & Pashcal, B. M. (2005). Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic*, 6: 187-198.

39. Pollex, R. L. & Hegele, R. A. (2004). Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Clin Genet* 66: 375-381.
40. Saxena, S. & Kumar, S. (2020). Pharmacotherapy to gene editing: potential therapeutic approaches for Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *GeroScience*, 42: 467-494.
41. Shmulevich, R. & Krizhanovsky, V. (2020). Cell senescence, DNA damage and metabolism. *Antiox Redox Signal*.
42. Sikora, E., Bielak-Zmijewska, A. & Mosieniak, G. (2018). What is and what is not cell senescence. *Postepy Biochemii*, 64 (2-3): 110-118.
43. Squarzoni, S., Schena, E., Sabatelli, P., Mattioli, E., Capanni, C., Cenni, V... & Lattanzi, G. (2020). Interleukin-6 neutralization ameliorates symptoms in prematurely aged mice. *Aging Cell*, 20: e13285.
44. Xu, Q., Mojiri, A., Boulahouache, L., Morales, E., Walther, B. K. & Cooke, J. P. (2022). Vascular senescence in progeria: role of endothelial dysfunction. *Eur Heart J.*, 2: 1-16.
45. Xu, Z., Duc, K. D., Holcman, D. & Teixeira, M. T. (2013). The length of the shortest telomere as the major determinant of the onset of replicative senescence. *Genetics*, 194: 847-857.
46. Zhang, H. & Sun, S.C. (2015). NF- κ B in inflammation and renal diseases. *Cell Biosci*, 5:63.