



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**ALTERACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE
LAS CALPAÍNAS INDUCIDA POR ARSÉNICO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

P R E S E N T A

JUAN PABLO PÁNICO MOLINA

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. ANA MARÍA SALAZAR MARTÍNEZ

2013





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

| | |
|---|---|
| 1. Datos del alumno | 1. Datos del Alumno |
| Apellido paterno | Pánico |
| Apellido materno | Molina |
| Nombre(s) | Juan Pablo |
| Teléfono | 5579-8436 |
| Universidad Nacional Autónoma de México | Universidad Nacional Autónoma de México |
| Facultad de Ciencias | Faculta de Ciencias |
| Carrera | Biología |
| Número de cuenta | 306143791 |
| 2. Datos del tutor | 2. Datos del Tutor |
| Grado | Doctora |
| Nombre(s) | Ana María |
| Apellido paterno | Salazar |
| Apellido materno | Martínez |
| 3. Datos del sinodal 1 | |
| Grado | Doctora |
| Nombre(s) | Sara |
| Apellido paterno | Frías |
| Apellido materno | Vázquez |
| 4. Datos del sinodal 2 | |
| Grado | Maestro en Ciencias |
| Nombre(s) | Miguel Angel |
| Apellido paterno | Palomino |
| Apellido materno | Garibay |
| 5. Datos del sinodal 3 | |
| Grado | Doctora |
| Nombre(s) | Ivette |
| Apellido paterno | Caldelas |
| Apellido materno | Sánchez |
| 6. Datos del sinodal 4 | |
| Grado | Doctora |
| Nombre(s) | Andrea Sachi |
| Apellido paterno | Díaz |
| Apellido materno | Villaseñor |
| 7. Datos del trabajo escrito. | |
| Título | Alteración de la funcionalidad de las calpaínas inducida por arsénico |
| Número de páginas | 42 |
| Año | 2013 |

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad y el apoyo para formarme en la Facultad de Ciencias a través de una educación excelente.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas por permitirme utilizar sus instalaciones para la realización de este trabajo.

Agradezco especialmente a la Dra. Patricia Ostrosky Shejet por permitirme trabajar en su laboratorio y brindarme el apoyo para la realización de este proyecto.

A mi asesora, Dra. Ana María Salazar Martínez agradezco profundamente el apoyo, asesoramiento y enseñanzas recibidas durante la realización de este trabajo

A la Q.F.B. Lourdes Monserrat Sordo Cedeño por el apoyo técnico en la realización de este trabajo.

Al Q.F.B. Carlos Castellanos Barba por el apoyo técnico en el manejo del citómetro de flujo.

APOYO ECONÓMICO

Este trabajo se realizó gracias al financiamiento parcial de:

Instituto de Salud Kellogg's

Consejo Nacional de la Ciencia y la Tecnología (CONACYT)

Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica
(PAPIIT-UNAM)

Fundación Miguel Alemán

君なくて
まことに多大の
木立かな
小林一茶

Sin ti

Demasiado enorme

sería el bosque.

Kobayashi Issa.



En nuestro breve paso por el mundo conocemos personas que cambian la forma en como concebimos la realidad y el cauce por el que se conducen las aguas de nuestra existencia... esta tesis va dedicada a todos aquellos que me ayudaron a crecer y apoyaron a lo largo de los años.

A mi madre, Linda, por haberme brindado la oportunidad de respirar y apoyarme toda la infancia con mis ideas y proyectos y por todo el cariño.

A mis abuelos Alejandro y Mercedes, por el apoyo incondicional y el cariño que me han tenido siempre y por apoyar cuanto proyecto e idea loca he tenido.

A mi tutora, Dra. Ana María Salazar, por haber creído en mí y mostrarme el camino para llegar a ser un investigador. Por todo el cariño y paciencia que ha mostrado desde el día que llegué al laboratorio. Porque sin usted este logro, que espero sea el primero de muchos, no se habría alcanzado.

A la Dra. Patricia Ostrosky, no sólo por permitirme trabajar en su laboratorio, sino además, por impulsarme para ser investigador y darme todo el apoyo que me ha dado.

A Monserrat Sordo por el apoyo en el trabajo del laboratorio que me has dado y sobre todo por esa gran calidad humana y la hermosa amistad que ha crecido con el paso de estos años.

A José Luis López Robledo por ser más que un maestro, por ser mi mentor, padre y amigo, por escucharme y aconsejarme cuando más lo necesité. No existen palabras que puedan expresar el cariño que siento por ti, por Almita y Artemisa que tan cálidamente me han apoyado durante más de la mitad de mi vida.

A los que con el pasar de los años han llegado a ser mis hermanos, Diana Franco, Diana Espadas, Diana Ríos, Verito, Sandra y Annita. Gracias por todo el apoyo y cariño, por todos esos momentos de risas, de lágrimas y de irreverencia absoluta que compartimos.

A los miembros de Takumi Bonsai, especialmente a Marcela, Maru, Luis Gerardo y Luis Petrone por ser mi segunda familia desde hace tantos años, por todos los momentos de risas y porque me han ayudado a madurar y a crecer.

| ÍNDICE | Pag. |
|--|-------------|
| Resumen | 1 |
| Introducción | 2 |
| La Diabetes Mellitus Tipo 2 | 2 |
| Contaminación Ambiental por Arsénico | 3 |
| Efectos Tóxicos del Arsénico | 5 |
| El Arsénico como Factor de Riesgo para la Diabetes | 6 |
| Calpaínas | 7 |
| La Calpaína-10 en la Diabetes Mellitus tipo 2 | 11 |
| El linfocito como Modelo de Estudio de la DM2 | 13 |
| Justificación | 16 |
| Hipótesis | 16 |
| Objetivo general | 16 |
| Objetivos particulares | 16 |
| Métodos | 17 |
| Resultados | 21 |
| Características de los donadores | 21 |
| Viabilidad celular | 21 |
| Modulación de la expresión de calpaína-10 | 23 |
| Actividad de calpaínas | 24 |
| Discusión | 29 |
| Conclusión | 34 |
| Referencias | 35 |

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

| | Pag. |
|--|-------------|
| Figura 1 Principales efectos del arsénico en la célula | 5 |
| Figura 2 Efectos del arsénico en la homeostasis de la glucosa | 6 |
| Figura 3 Estructura y expresión de la familia de las calpaínas | 8 |
| Figura 4 Activación de las calpaínas por calcio | 10 |
| Figura 5 Papel de la calpaína-10 en la homeostasis de la glucosa | 12 |
| | |
| Resultados | |
| Figura 6 Efecto del arsénico en la viabilidad celular | 22 |
| Figura 7 Efecto del arsénico en la expresión de calpaína-10 | 23 |
| Figura 8 Actividad de calpaínas en células viables y muertas | 24 |
| Figura 9 Efecto del arsénico sobre la actividad de calpaínas en la población total de linfocitos | 25 |
| Figura 10 Efecto del arsénico sobre la actividad de calpaínas en las distintas poblaciones de células | 27-28 |
| Tabla 1 Datos antropométricos de los donadores | 21 |
| Tabla 2 Datos bioquímicos de los donadores | 21 |

ABREVIATURAS

7AAD- 7 amino actinomicina

ANOVA- Análisis de varianza

As III- Arsénico trivalente

AV-PE- Anexina V conjugada con ficoeritrina

C2L- Dominio parecido al dominio C2

CysPC- Dominio de proteasa de cisteína parecido a calpaína

DM- Diabetes Mellitus

DM2- Diabetes Mellitus tipo 2

DSMA- Metil arsenato disódico

GLUT- Transportador de glucosa

GSH- Glutación

HDL- Lipoproteínas de alta densidad

IMC- Índice de masa corporal

KRH- Krebs ringer HEPES

LDL- Lipoproteínas de baja densidad

MSMA- Metil arsenato monosódico

NMD- Degradación de RNA mediada por falta de sentido

PBMC- Células mononucleares de sangre periférica

PEF- Dominio de penta mano EF

PHA- Fitohemaglutinina

RyR2- Receptor de rianodina 2

SNAP25- Proteína sinaptosomal de 25 kDa

tBoc-Leu-Met-CMAC- Amino-4-Chloromethylcoumarin, t-BOC-L-Leucyl-L-Methionin amida

Δ [Glc]ec- Cambio en la concentración de glucosa extracelular

En algún lugar, algo increíble está esperando por ser descubierto.

Carl Sagan

RESUMEN

Estudios epidemiológicos muestran una asociación entre la exposición crónica a arsénico y un aumento en la prevalencia de diabetes mellitus tipo 2 (DM2), sugiriendo que el arsénico es un importante factor de riesgo para el desarrollo de esta enfermedad. En las células beta pancreáticas, el arsénico disminuye la secreción de insulina a través de la inhibición de la proteólisis de SNAP-25 mediada por la calpaína-10. Esta proteasa está involucrada tanto en la secreción de la insulina como en la respuesta a esta hormona en tejidos periféricos. Trabajos previos en el grupo de trabajo mostraron que la actividad de calpaínas en linfocitos es dependiente de glucosa y está disminuida en pacientes diabéticos.

Con la finalidad de entender el mecanismo de alteración de la homeostasis de la glucosa inducida por el arsénico en tejidos periféricos, en este trabajo se evaluó el efecto del arsenito de sodio sobre la actividad de las calpaínas bajo condiciones normoglucémicas e hiperglucémicas, así como su efecto sobre la expresión proteica de la calpaína-10. Se trataron linfocitos con 0.1 y 1 μM de arsenito de sodio durante 72 horas. Se midió el efecto citotóxico del arsenito por tinción con Anexina V/7AAD. La expresión de las isoformas de calpaína-10 se cuantificó por inmunodetección. La actividad de calpaínas se analizó por citometría de flujo, bajo condiciones normoglucémicas e hiperglucémicas (3.9 mM y 11.1 mM de glucosa respectivamente) usando el sustrato tBoc-CMAC. Los resultados mostraron que las concentraciones de arsénico utilizadas no indujeron cambios significativos en la viabilidad celular y en la expresión de las isoformas de calpaína-10. La actividad de las calpaínas bajo condiciones hiperglucémicas disminuyó dependiente de la dosis de arsénico, sin afectar significativamente la actividad basal en condiciones normoglucémicas.

El arsénico es capaz de inhibir la capacidad de las calpaínas en el linfocito para responder a cambios extracelulares de glucosa. Este trabajo aporta información que permite entender cómo el arsénico es capaz de alterar procesos relacionados con la homeostasis de la glucosa.

INTRODUCCION

La Diabetes Mellitus Tipo 2

La diabetes mellitus (DM) es un grupo heterogéneo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia debido a defectos en la secreción y/o acción de la insulina (American Diabetes Association, 2012).

Existen diversos procesos asociados al desarrollo de la diabetes, lo cual origina distintas formas de esta enfermedad. La gran mayoría de los casos de diabetes se encuentran dentro de dos categorías etiopatogénicas. En la DM tipo 1 se incluyen el 5 al 10 % de los casos y es provocada por la destrucción autoinmune de las células β . Por otra parte, en la DM tipo 2 (DM2) se encuentran la gran mayoría de los casos (90-95 %) y se presenta en individuos con resistencia a la insulina y que usualmente tienen una deficiencia en esta hormona. Existen además otros tipos de diabetes entre las que se encuentran las de tipo monogénico que afectan la funcionalidad de la célula β (MODY's), gestacional, entre otras (American Diabetes Association, 2012). La hiperglucemia crónica presente en esta enfermedad está asociada con daño a largo plazo, disfunción y falla de diferentes órganos, especialmente ojos, riñones, sistema nervioso, así como de la macro y microvasculatura (American Diabetes Association, 2012).

En menos de cuatro décadas, la diabetes se ha convertido en el problema más importante de salud en México, por ejemplo, en el 2000, fue la 11° causa de hospitalización. Además, el número de casos reportados por la Secretaria de Salud ha incrementado de 71,600 en 1984 a 315, 948 casos/ 1,000,000 de habitantes en el 2002. Esta enfermedad también se ha convertido en la principal causa de muerte en mujeres y la segunda en hombres. Si se combina la mortalidad por diabetes con la de sus principales complicaciones como enfermedad coronaria e infarto, se explica el 30 % de las muertes totales (Rull et al., 2004).

La DM2 está considerada como una enfermedad compleja, ya que su desarrollo se encuentra influenciado por factores genéticos y ambientales, particularmente el estilo de vida (Diamond, 2003; Marx, 2002). Estos factores no participan de manera aislada, sino que interactúan entre sí, produciendo diversos efectos (Kaput, et al., 2007).

Contaminación Ambiental por Arsénico

El arsénico es un elemento del grupo VA de la tabla periódica, su número atómico es 33 y su peso atómico es 74.9. Se le clasifica como metaloide por poseer características físicas y químicas tanto de los metales como de los no metales.

Es un elemento natural ampliamente distribuido en la corteza terrestre. En el ambiente se combina con oxígeno, cloro y azufre, formando compuestos de arsénico inorgánico. Por otro lado, los compuestos orgánicos se forman por la combinación del arsénico con carbono e hidrógeno (Platanias, 2009; ATSDR, 2005). Este elemento se encuentra en dos estados de oxidación principales: As^{3+} (arsenito, As III) y As^{5+} (arsenato, As V). De estos, los compuestos con As III son más tóxicos que sus análogos con As V (Ötles et al., 2010; Platanias, 2009).

El arsénico inorgánico está principalmente en las rocas y el suelo, especialmente en aquellos con depósitos de plomo o cobre. En cambio, el arsénico orgánico se encuentra en organismos acuáticos, formando compuestos como la arsenobetaina, la cual es una forma poco tóxica del arsénico, así como en alimentos y en pesticidas tales como el ácido cacodílico, metilarsenato disódico (DSMA) y el metilarsenato monosódico (MSMA) (Ötles et al., 2010; ATSDR, 2005).

Las fuentes de exposición a arsénico pueden ser naturales o generadas por actividades humanas. Este elemento es liberado de manera natural a los cuerpos subterráneos de agua, aire y suelo como resultado de la actividad volcánica y la erosión de los depósitos naturales. Por otro lado, las fuentes de origen antropogénico están asociadas a los diversos usos que tienen los compuestos derivados de este elemento (Mitchell et al, 2011). En la actualidad, el uso más

importante es como preservativo de madera en forma de arsenato cromado de cobre, sin embargo, no se sabe si los productos de madera tratados con este compuesto pudieran contribuir a la exposición de la gente al arsénico. Por otro lado, en la agricultura se utilizan compuestos orgánicos de arsénico como pesticidas en cultivos de algodón y huertas, principalmente el ácido cacodílico, el DSMA y el MSMA. Otro uso importante del arsénico es en semiconductores y diodos (ATSDR, 2005).

La vía de exposición más común es la oral, mediante la ingesta de agua contaminada y alimentos como el arroz, pescado y leche, lo cual se ha convertido en un problema alarmante en los últimos años (Ötes et al., 2010; ATSDR, 2005). La inhalación de compuestos con arsénico ocurre principalmente en ocupaciones como la agricultura, industria de la madera, vidrio y microelectrónica (Garelick et al., 2008).

La contaminación del agua potable con arsénico se considera un problema mundial de salud. Países como México, Bangladesh, Estados Unidos, Taiwán, Japón, China, Finlandia, Nueva Zelanda, Vietnam, Filipinas, Argentina y Chile presentan problemas por hidroarsenicismo (Mitchell et al., 2011). Además, en nuestro país existen poblaciones que están expuestas a elevadas concentraciones de arsénico, tales como La Comarca Lagunera en los estados de Coahuila y Durango, así como en Puebla, San Luis Potosí, Sonora, Morelos, Chihuahua, Hidalgo, etc. (Bundschuh et al., 2012). La Organización Mundial de la Salud ha establecido como límite máximo una concentración de 10 µg/l de arsénico en el agua destinada para consumo humano, sin embargo, se estima que en América Latina alrededor de 4.5 millones de personas consumen agua con niveles mayores a 50 µg/L de arsénico (Bolt, 2012).

La toxicidad por arsénico en humanos suele asociarse a la exposición de compuestos inorgánicos de arsénico, especialmente los trivalentes, sin embargo,

los compuestos orgánicos también son capaces de generar daño genotóxico (Bolt, 2012; ATSDR, 2005).

Efectos tóxicos del Arsénico

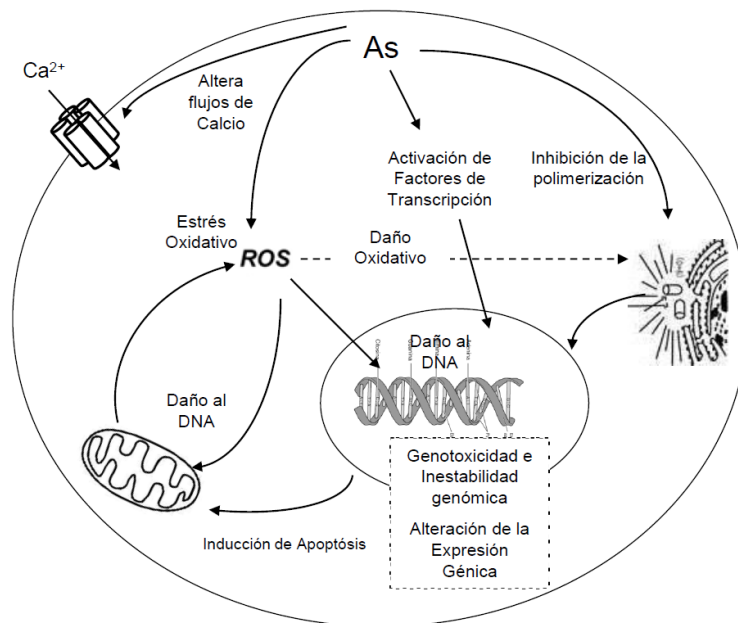


Figura 1. Principales efectos del arsénico en las células.

El arsénico puede ser absorbido por inhalación, ingestión o por penetración en la piel o las mucosas. Una vez en el torrente sanguíneo, el arsénico trivalente (As III), que a un pH fisiológico se disuelve en agua formando arsenito, se internaliza para su metabolismo por los hepatocitos por difusión simple y facilitada

utilizando proteínas transmembranales, como aquagliceroporinas y transportadores de hexosa permeasa (Liu et al., 2006; Torres-Avila et al., 2010). En su interior, este metaloide se metaboliza para dar lugar a la formación de arsénico trivalente y pentavalente, así como a especies mono-, di- y tri-metiladas (Kitchin, 2001; Styblo et al, 2002; Aposhian y Aposhian, 2006).

La toxicidad del arsénico es mediada por varios mecanismos (figura 1), entre estos, induce deficiencia en la respiración celular por medio de la inhibición de varias enzimas mitocondriales y el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, disminuye la producción de óxido nítrico en el endotelio, induce estrés oxidativo por el aumento en la lipoperoxidación, altera la expresión de diversos genes y altera los flujos de calcio en la célula (Suriyo et al., 2012; Plataniias, 2009; ATSDR,

2005). Este metaloide también tiene importantes efectos genotóxicos, que son evidenciados por la inducción de daño oxidativo al DNA, formación de aductos, aberraciones cromosómicas, micronúcleos y aneuploidía. Además, el As III reacciona con moléculas que tienen grupos tioles, tales como el glutatión y la cisteína en las proteínas. También se ha observado que algunas especies de arsénico orgánico inhiben la actividad de enzimas antioxidantes (Gentry et al., 2010; Plataniias, 2009; ATSDR, 2005).

El Arsénico como Factor de Riesgo para la Diabetes

La exposición crónica a arsénico está asociada al desarrollo de varias patologías, entre las que se encuentra la DM2. Estudios epidemiológicos han mostrado un incremento en la prevalencia de DM2 de manera dosis-dependiente en regiones con hidroarsenicismo tales como Bangladesh, Taiwán, Suecia y México

(Islam et al., 2012; Del Razo et al., 2011; Huang et al., 2011). Estos estudios siguen siendo objeto de debate, pues estas poblaciones están expuestas a altas concentraciones de arsénico inorgánico, mientras que en regiones con bajas concentraciones de arsénico, o en personal laboralmente expuesto, estos resultados han sido inconsistentes (Islam et al., 2012; Del Razo et al., 2011; Huang et al., 2011).

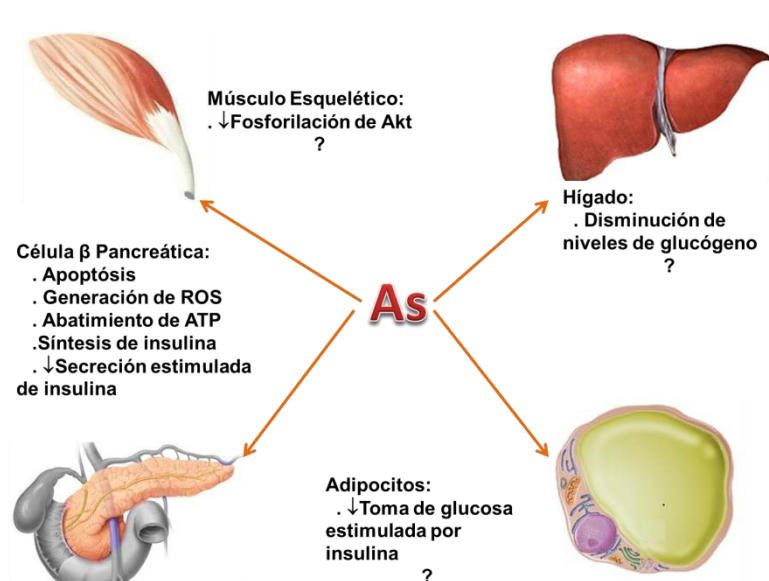


Figura 2. Efectos del arsénico en los principales órganos que participan en la regulación de los niveles plasmáticos de glucosa. Adaptado de Huang et al., 2011.

Por otro lado, algunos estudios *in vitro* han mostrado que el arsénico puede interferir con la homeostasis de la glucosa. En células β se ha observado que el arsénico provoca daño por estrés oxidativo, apoptosis y disminuye la transcripción del gen de la insulina. Además, el arsénico provoca alteraciones en la secreción de la insulina, mediante la reducción en los flujos de calcio (Ca^{2+}) que activan a calpaína-10, lo cual conlleva a una menor proteólisis de SNAP-25, que es necesaria para la secreción estimulada de insulina (Figura 2) (Díaz-Villaseñor et al., 2008; Díaz-Villaseñor et al., 2006; Huang et al., 2011).

En el caso de tejidos periféricos que responden a la insulina, el arsénico disminuye la toma de glucosa estimulada por insulina en adipocitos, así como también altera la fosforilación de PDK-1 y Akt, proteínas importantes en la señalización por insulina. En músculo esquelético, la exposición a arsénico *in vitro* inhibe la miogénesis y la fosforilación de Akt (Figura 2) (Huang et al., 2011).

Los estudios *in vivo* con animales han mostrado además que la exposición a arsénico en el agua de bebida genera resistencia a la insulina, aumento en los niveles de colesterol LDL y aumento en la tasa de absorción de glucosa en el intestino (Palacios et al., 2012). Además, se ha propuesto que el arsénico induce intolerancia a la glucosa por mecanismos distintos a los generados por dietas obesogénicas (Paul et al., 2011). A pesar de todos estos resultados, los mecanismos mediante los cuales el arsénico induce diabetes no han sido completamente dilucidados (Huang et al., 2011).

Calpaínas

Las calpaínas constituyen un grupo de proteasas intracelulares de cisteína que se encuentran en casi todas las células eucariontes (Sorimachi et al., 2011). Se definen por la similitud de su secuencia primaria con el dominio de proteasa de cisteína homóloga a calpaínas (CysPC) de la subunidad grande de la μ -calpaína humana (Sorimachi et al., 2011). Además del dominio catalítico, las calpaínas presentan una gran diversidad de dominios adicionales. La superfamilia de las

calpaínas se divide en dos grupos de acuerdo a la estructura de estos dominios. Debido a que las subunidades grandes de la μ - y m-calpaínas son el punto de referencia para la estructura de esta familia, las calpaínas que poseen una estructura de dominios similar a estas son llamadas calpaínas clásicas. En el humano existen 9 genes que codifican para calpaínas clásicas: *CAPN1*, *CAPN2*, *CAPN3*, *CAPN8*, *CAPN9*, *CAPN11* – 14 (Figura 3) (Ono et al., 2012; Sorimachi et al., 2011). La estructura básica de estas enzimas consta de un dominio denominado hélice- α de anclaje o dominio I, el cual se autolisa durante la activación de la proteasa, el dominio de proteasa CysPC o dominio II, un dominio similar en estructura terciaria al dominio C2 (C2L) o dominio III, el cual contiene sitios de unión a fosfolípidos y finalmente el dominio de penta mano EF (PEF) o

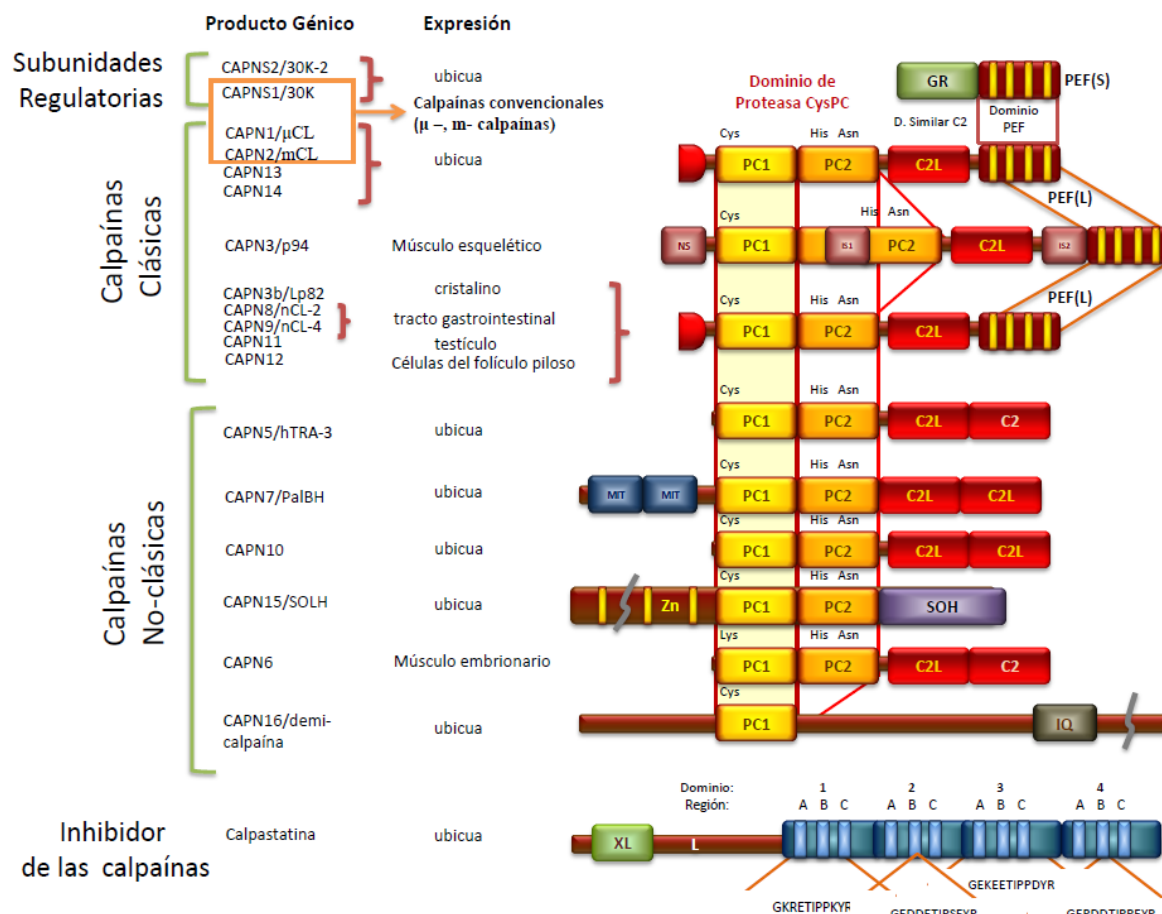


Figura 3. Clasificación, expresión y estructuras esquemáticas de las calpaínas humanas, así como de su inhibidor endógeno, la calpastatina. Modificado de Sorimachi et al., 2011.

dominio 4, el cual contiene 5 motivos de mano EF, de los cuales, el quinto contribuye a la heterodimerización con la subunidad reguladora CAPNS1, mientras que los demás actúan como sitios de unión a Ca^{2+} (Sorimachi et al., 2011).

Por otro lado, las calpaínas no clásicas pueden tener dominios accesorios tanto en el N- como en el C- terminal del dominio CysPC. Este grupo también incluye a muchas variantes generadas por splicing alternativo de genes de calpaínas típicas, tales como *CAPN8*. Este grupo, además, es clasificado en varias subfamilias de acuerdo a sus características estructurales. En el humano existen seis genes que codifican para calpaínas no clásicas: *CAPN5*, *CAPN6*, *CAPN7*, *CAPN10*, *CAPN15*, *CAPN16* (Figura 3) (Ono et al., 2012; Sorimachi et al., 2011).

Para activarse, las calpaínas convencionales (μ - y m - calpaínas) requieren de la unión de iones Ca^{2+} . Si bien los sitios más evidentes de unión a calcio se localizan en los motivos de mano EF del dominio PEF, la estructura tridimensional revela que este dominio se encuentra espacialmente muy alejado del sitio catalítico (Figura 4). Además, se ha demostrado que el dominio de proteasa presenta por sí mismo actividad dependiente de calcio y estudios enfocados a la estructura tridimensional de estos dominios muestran que estos iones se unen directamente a sitios de unión a calcio en PC1 y PC2 que son exclusivos de esta familia de proteasas, generando la rotación del dominio PC2, y acercando a los residuos catalíticos (Cys en PC1 y His y Asn en PC2) formando el surco del sitio activo (Figura 4) (Sorimachi et al., 2011).

Además de la unión a calcio, se ha observado que la unión a fosfolípidos también juega un papel importante en la regulación de las calpaínas convencionales, dado que disminuye la concentración de Ca^{2+} necesaria para la activación de estas enzimas (Ono et al., 2012). También se han propuesto diversos mecanismos de regulación que son específicos para ciertas calpaínas, por ejemplo, la autólisis en calpaína-7 y la alineación de los residuos catalíticos en calpaína-9 (Sorimachi et al., 2011).

Actualmente, se desconocen las pautas que rigen la especificidad por los sustratos de estas proteasas. El tamaño reducido del surco del dominio catalítico,

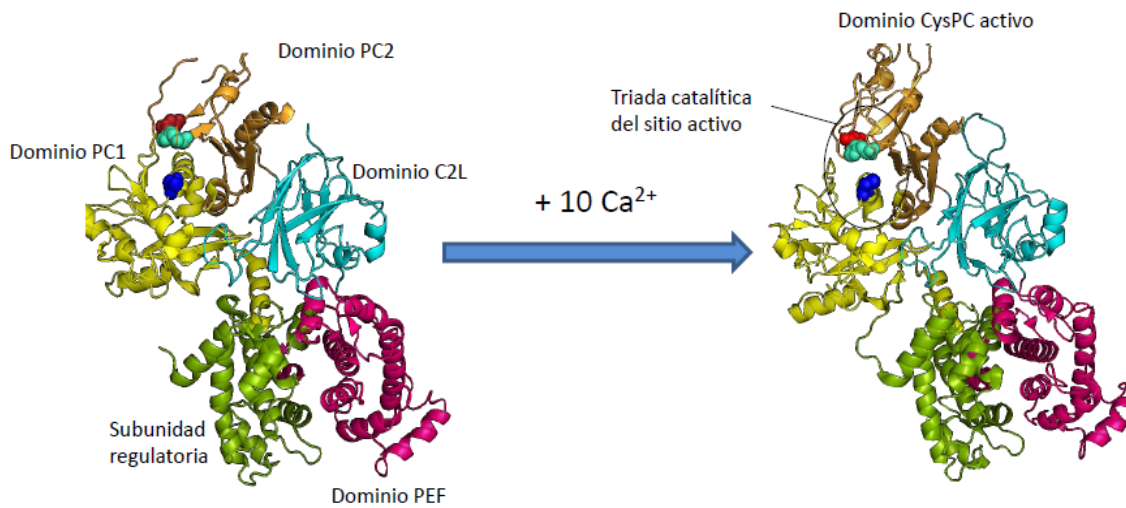


Figura 4. Esquema de la estructura en 3D de la m-calpaína humana inactiva y activa usando datos obtenidos del PDB, 1KFX y 1KFU. En colores se marcan los distintos dominios de la proteasa: PC1, amarillo; PC2 en naranja, C2L en azul claro, PEF en magenta. En verde se muestra la subunidad reguladora CAPNS1. Los residuos catalíticos se muestran en modelo de esferas: Cisteína 115 en azul, histidina 272 en verde cian y asparagina 296 en rojo (Modificado de Sorimachi et al., 2011).

conservado entre todas las calpaínas, presenta limitaciones en cuanto a la estructura terciaria que pueden tener los sustratos, por lo que se cree que realizan cortes preferentemente en zonas inter-dominio no estructuradas como lo hacen las calpaínas convencionales. Por otro lado, nuevos sustratos identificados para otras calpaínas no son necesariamente buenos sustratos para las calpaínas convencionales. Esto sugiere la importancia de la interfaz entre el sustrato y la proteasa. Se ha propuesto que posibles sitios de corte podrían no entrar en el sitio activo si el sustrato no forma un complejo estable con la calpaína (Ono et al., 2012).

Las calpaínas han sido asociadas a diferentes procesos celulares como son: motilidad celular, transducción de señales, reparación de membrana, apoptosis, diferenciación, necrosis, desarrollo embrionario, transmisión sináptica, tráfico vesicular, entre algunas otras. Además, la desregulación de algunos miembros de esta familia se han asociado a diversas patologías, tales como isquemia cerebral,

daño traumático del cerebro y enfermedad de Alzheimer con la sobreactivación de calpaína-1 y calpaína-2, distrofia muscular de la cintura y extremidades tipo 2A (limb-girdle muscular dystrophy type 2A LGMD2A) con la disminución en la actividad de calpaína-3, cataratas por desregulación de calpaína-2 y variantes generadas por splicing de calpaína-3, cáncer gástrico por subexpresión de CAPN9 y nefropatía diabética por desregulación de calpaína-10 (Huang et al., 2001; Horikawa et al., 2000; Covington et al., 2012). Por otro lado, estudios genéticos han relacionado polimorfismos en genes que codifican para este tipo de enzimas con diversos defectos en diferentes organismos, incluyendo letalidad embrionaria (disrupción en *Capn2* en ratón), distrofia muscular (mutaciones de CAPN3 en humano), gastropatía (mutaciones en CAPN8 en ratón y humanos) y DM2 (CAPN10 en humano) (Sorimachi et al., 2011).

La Calpaína-10 en la Diabetes Mellitus tipo 2

La calpaína-10 se codifica por el gen *CAPN10* que se encuentra en el cromosoma 2q37.3 (Horikawa et al., 2000). Los polimorfismos de un sólo nucleótido SNP-43 G→A (rs3792267) y SNP-44 T→C (rs2975760), localizados en regiones intrónicas, han sido asociados tanto a un mayor riesgo de desarrollar DM2, como a diversas alteraciones metabólicas, tales como resistencia a la insulina, niveles elevados de glucosa en sangre y dislipidemias (Horikawa et al., 2000; Zhou et al., 2010; Lynn et al., 2002; Pérez-Martínez et al., 2011). Sin embargo, actualmente no existe una explicación bioquímica de cómo estos SNP's aumentan la susceptibilidad a desarrollar DM2 (Sorimachi et al., 2011).

CAPN10 transcribe para 8 isoformas generadas por splicing alternativo, designadas a-h (Horikawa et al., 2000). Sin embargo, no se ha demostrado que todas ellas codifiquen para algún polipéptido, e incluso se ha propuesto que 4 de estas isoformas son candidatas a degradación mediada por RNA sin sentido (NMD) (Green et al., 2003) y sólo se ha comprobado la actividad catalítica de las isoformas de 75 (calpaína-10a) 56 y 50 kDa (Giguere et al., 2008).

Esta enzima se expresa en casi todos los tipos celulares, por lo que se le ha considerado ubicua. Se ha identificado tanto el mRNA como la proteína en cerebro, corazón, riñón, hígado, pulmón, músculo, páncreas endocrino, placenta, estómago, retina y leucocitos (Horikawa et al., 2000; Marshall et al., 2005). Se ha observado que la expresión del mRNA de *CAPN10* en adipocitos, músculo esquelético, hígado y leucocitos está disminuida en ratas que desarrollan DM2 espontáneamente aun antes de presentar la patología (Sato et al., 2003).

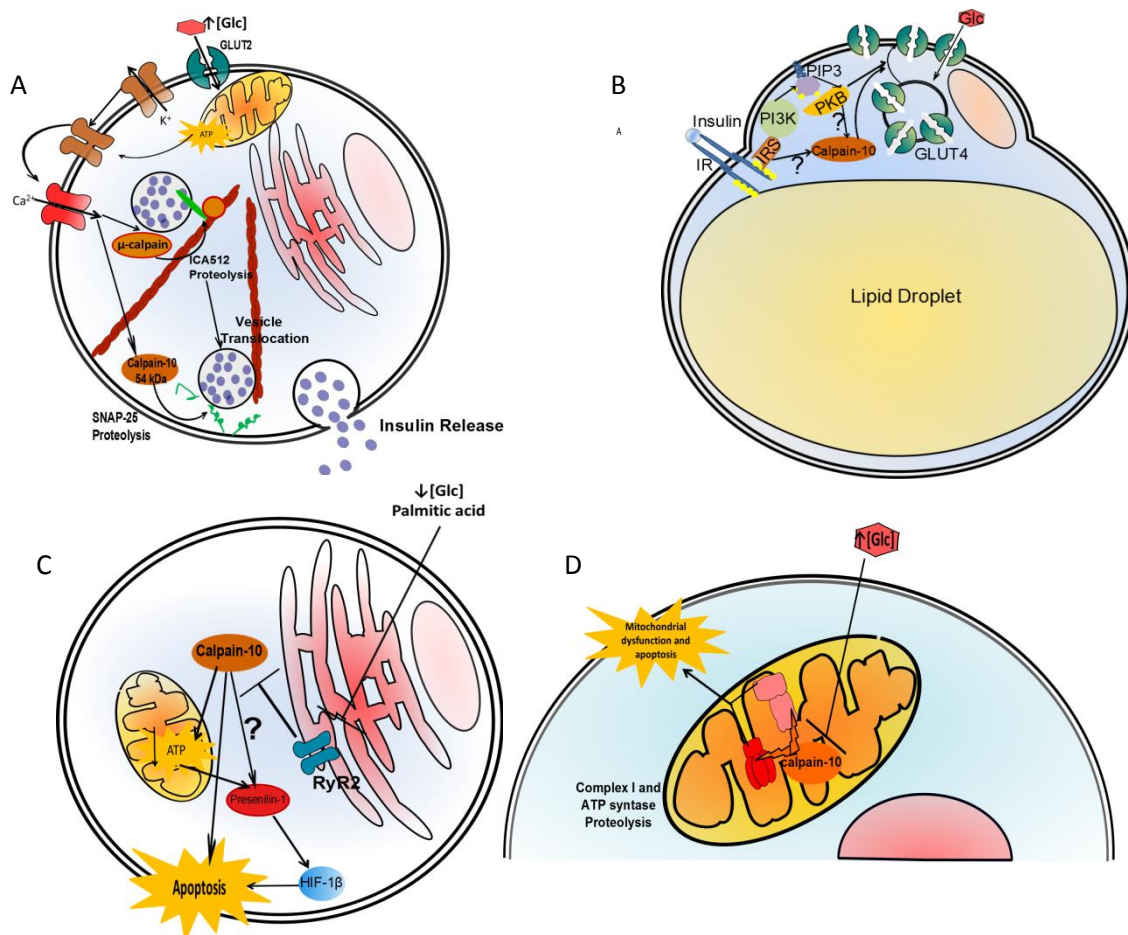


Figura 5.- Papel de la calpaína-10 en A) secreción de insulina a través de la proteólisis de SNAP25, lo cual genera la fusión de las vesículas de insulina con la membrana plasmática; B) papel de esta proteasa en la externalización de GLUT4 en adipocitos y en células musculares en respuesta a la insulina; C) en la apoptosis de las células β en respuesta a ambientes hipoglucémicos y de alta concentración de ácidos grasos, los cuales inactivan a RyR2, lo cual activa a calpaína-10; D) En el mantenimiento de la homeostasis mitocondrial y apoptosis de las células epiteliales de los túbulos de la nefrona en respuesta a la hiperglucémica crónica (Marshall et al., 2005; Paul et al., 2003; Brown et al., 2007; Johnson et al., 2004; Arrington et al., 2006).

La calpaína-10 participa en la secreción y en la acción de la insulina. En la célula β , los flujos de Ca^{2+} , que se generan en respuesta a cambios en la concentración extracelular de glucosa, estimulan la proteólisis de SNAP25 a través de la activación de calpaína-10, provocando la liberación de la insulina (Marshall et al., 2005) (Figura 5 a). También se ha descrito tanto en músculo esquelético como en adipocitos, que calpaína-10 regula la externalización del transportador de glucosa 4 (GLUT4) en respuesta a la insulina, mediante la remodelación del citoesqueleto de actina (Paul et al., 2003; Brown et al., 2007) (Figura 5 b).

Además, también está involucrada en la apoptosis de las células β , mediada por la activación de RyR2 por bajas concentraciones de glucosa extracelular y exposición a ácido palmítico (Johnson et al., 2004) (Figura 5 c). Por otro lado, en el riñón cumple un papel importante en la degradación de proteínas mitocondriales, específicamente NDUFV2, NDUFB8 y ATP sintasa β (Arrington et al., 2006), lo cual ayuda a mantener las funciones normales de este organelo, provocando apoptosis por disfunción mitocondrial cuando la proteasa es desregulada tanto por hiperglucemia crónica, como por envejecimiento (Covington et al., 2012; Covington et al., 2009) (Figura 5 d).

El Linfocito como Modelo de Estudio de la DM2

Los linfocitos son células del sistema inmune que reconocen y responden de forma específica a antígenos extraños y que median respuestas tanto humorales como celulares (Abbas et al., 2004). Estas células son metabólicamente muy activas, pues se encargan de sintetizar una gran cantidad de proteínas, tales como citocinas, y quimiocinas entre otras. Para sostener estas tasas metabólicas aún en estado quiescente, emplean principalmente glucosa y glutamina como fuentes de energía y de carbono para la síntesis de otras moléculas (Takahashi et al., 2011).

Varios autores han propuesto a los leucocitos como un modelo útil en el estudio de la DM2 ya que las vías de señalización del Ca^{2+} en estas células están bien descritas, presentan analogías en la plasticidad de los canales iónicos con células

excitables tales como las células β (Balasubramanyam et al., 2002). Durante su activación, los linfocitos adquieren sensibilidad a la insulina y se induce la expresión de GLUT4 (Goodman et al., 1993; Maratou et al., 2007). Los linfocitos de pacientes con síndrome metabólico presentan un menor consumo de glucosa tanto de manera basal como estimulado por insulina, aún después de ser inmortalizados con el virus de Epstein-Barr (Piatkiewicz et al., 2010; Morii et al., 2005).

Además, se ha observado que los leucocitos de ratas diabéticas y los linfocitos de niños con obesidad presentan una menor expresión del mRNA de calpaína-10 (Sato et al., 2003; Mendoza-Lorenzo et al. 2013), y un estudio previo de nuestro grupo mostró que las calpaínas en el linfocito responden a cambios en la concentración de glucosa extracelular, y esta respuesta se encuentra disminuida en los linfocitos de pacientes con DM2 (Díaz-Villaseñor et al., 2008). Además, son de fácil acceso en comparación con el músculo esquelético y los adipocitos, cuyos métodos de obtención suelen ser más invasivos (Piatkiewicz et al., 2010; Dimitriadis et al., 2005; Sato et al., 2003)

También se ha observado que las alteraciones en el metabolismo de la glucosa en los linfocitos de individuos con DM2, podrían ser una de las razones por las cuales los pacientes son susceptibles a una mayor incidencia de enfermedades infecciosas y de ciertos tipos de cáncer (Oleszczak et al., 2012; Kipmen-Korgun et al., 2009; Moriguchi et al. 1997). Entre las funciones que se ven alteradas como consecuencia de la disminución en el metabolismo de la glucosa, se encuentran: la adhesión al endotelio, migración a sitios de inflamación, quimiotaxis, actividad bactericida, fagocitosis y la producción de especies reactivas de oxígeno (Kipmen-Korgun et al., 2009; Piatkiewicz et al., 2007).

Estas alteraciones podrían deberse a cambios en la regulación de los transportadores de glucosa (GLUTs), pues el aumento en el transporte de glucosa dependiente de GLUT1 es limitante para la activación de los linfocitos T (Jacobs et al., 2008). El linfocito humano en estado quiescente expresa principalmente

GLUT1, GLUT3 y GLUT6, mientras que en el estado activado se incrementa la expresión de GLUT1 y se induce la expresión de GLUT4 (Oleszczak et al., 2012; Chakrabarti et al., 1994).

Estudios *in vitro* han mostrado que el transporte de glucosa está disminuido en linfocitos cultivados bajo condiciones hiperglucémicas, aunque los cambios de expresión de los transportadores presentan una respuesta diferencial, dado que en linfocitos B se observa la sobreexpresión de GLUT3 en la membrana, mientras que disminuye en los linfocitos T, además, la expresión global de GLUT1 disminuye, mientras que la de GLUT4 aumenta (Oleszczak et al., 2012).

De la misma forma, estudios en pacientes muestran que el transporte de glucosa se encuentra disminuido en linfocitos de individuos diabéticos (Piatkiewicz et al., 2007). Además, la expresión en la membrana plasmática de GLUT3 en los linfocitos de pacientes con DM2 se encuentra disminuida (Kipmen-Korgun et al., 2009). Todos estos datos sugieren que el linfocito es un buen modelo para estudiar cambios en la regulación de las vías involucradas en la translocación de los GLUTs en el desarrollo de la DM2.

JUSTIFICACIÓN

Debido a que la exposición a arsénico ha sido relacionada con un aumento en la prevalencia de DM2, es importante estudiar los posibles mecanismos a través de los cuales este metaloide contribuye a su desarrollo.

HIPÓTESIS

La exposición subcrónica a concentraciones no citotóxicas de arsenito de sodio *in vitro* disminuirá la capacidad de los linfocitos para responder a cambios en la glucosa extracelular a través de la actividad de las calpaínas.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del arsenito de sodio sobre la expresión de la calpaína-10 y la actividad de las calpaínas bajo condiciones normoglucémicas e hiperglucémicas en linfocitos humanos.

OBJETIVOS PARTICULARES

Evaluar la citotoxicidad y la inducción de apoptosis en linfocitos humanos tratados con arsenito de sodio.

Evaluar el efecto de la exposición a arsenito de sodio en la expresión de la proteína calpaína-10.

Evaluar el efecto del arsenito de sodio sobre la actividad de las calpaínas en linfocitos humanos bajo condiciones normoglucémicas e hiperglucémicas.

MÉTODOS

Obtención de muestras de sangre periférica humana y perfil lipídico

Por medio de punción venosa se tomaron aproximadamente 30 ml de sangre periférica en tubos heparinizados de 3 donadores de sexo masculino, a los que se les aplicó un cuestionario para evaluar que cumplieran con los siguientes criterios de inclusión: edad de entre 20 y 30 años, que no hubiesen tenido enfermedades infecciosas en las 2 semanas previas a la toma de muestra, que no padecieran enfermedades crónico degenerativas o que se encontraran bajo algún tratamiento médico y que tuvieran 8 a 10 h de ayuno.

Para la determinación de glucosa, triglicéridos, colesterol total y C-HDL se tomó una alícuota de sangre en un tubo con EDTA. Los parámetros bioquímicos se midieron con un fotómetro de reflexión automático Reflotron® Plus (Roche). Para la determinación del C-LDL se empleó la fórmula de Friedewald (1972):
$$\text{LDL} = \text{TC} - \text{HDL} - \text{TG}/5.0 \text{ (mg/dL)}$$

Separación de linfocitos y tratamientos

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) fueron extraídas con un gradiente de ficoll (Hypaque, Sigma™), centrifugando 30 min a 2000 rpm. Las células fueron lavadas dos veces con PBS estéril. Para el conteo de las PBMCs, las células fueron resuspendidas en 1 ml de PBS, de esta suspensión celular se tomó una alícuota de 12 µl para hacer una dilución 1:50 con paraformaldehído al 4 % (volumen final de 600 µl). El conteo se realizó en un citómetro Attune™ (Applied Biosystems™), considerando únicamente la región correspondiente a los linfocitos, de acuerdo a sus características de tamaño y granularidad.

De cada muestra de sangre se sembraron por triplicado en placas de 24 pozos, 1×10^6 linfocitos en 2.5 ml de medio de cultivo RPMI-1640 sin glucosa (Sigma™), suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB), aminoácidos no esenciales 10 mM (Gibco™), L-glutamina 2 mM (Sigma™) y 5.6 mM de glucosa (condiciones normoglucémicas). Se preparó una disolución acuosa de arsenito de sodio 1 M y por diluciones seriadas se obtuvieron las concentraciones necesarias. Las células

se trataron con arsenito de sodio a concentraciones de 0.1 y 1.0 μM durante 72 h a 37° C en una incubadora humificada con 5 % de CO_2 durante 72 h.

Viabilidad y Detección de apoptosis mediante Anexina V/ 7AAD

Se evaluó la viabilidad celular mediante la tinción de la fosfatidil serina externalizada con Anexina V-Ficoeritrina (AV-PE, BD Pharmigen™) y de la integridad membranal con 7-amino-actinomicina D (7AAD, BD Pharmigen™). Se preparó una dilución 1:100 de AV-PE y 30 $\mu\text{l/ml}$ de 7AAD en Guava Nexin Buffer™ 1X (Guava Technologies). Se tomaron alícuotas por duplicado de 1.0×10^5 células y se centrifugaron a 5000 rpm por 5 min. Se resuspendieron en 150 μl del stock con AV-PE/7AAD. Se incubaron en oscuridad a 4 °C por 25 min. Una vez transcurrido este tiempo se añadieron 450 μl de Guava Nexin Buffer 1X y se evaluó la viabilidad por citometría de flujo en un citómetro Attune™, capturando 10,000 eventos por muestra.

Expresión de las proteínas calpaína-10 y β -Actina por Western Blot

Extracción y cuantificación de la proteína. Se realizó la extracción de la proteína total con buffer de lisis RIPA suplementado con inhibidores de proteasas (PMSF 319 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, ortovanadato de sodio 3.3 mM, NaF 30 mM, azida de sodio 1 mM y aprotinina 72.6 $\text{ng}/\mu\text{L}$ disueltos en PBS). Se centrifugó por 25 min a 1500 rpm y 4°C, recuperando el sobrenadante. La concentración de proteína se cuantificó por el método de Lowry (DC Protein Assay, Bio-Rad™), utilizando albúmina sérica bovina (Bio-Rad™) como estándar para hacer la curva patrón.

Electroforesis y Western Blot. Para analizar la expresión de las proteínas de interés, se cargaron 30 μg de proteína total con buffer de muestra (Tris 60 mM pH 6.8, glicerol 10.5 %, SDS 10 %, azul de bromofenol 0.05 % y β -mercaptoetanol 5 %) en geles de SDS-poliacrilamida al 12 %. Posteriormente, se realizó la transferencia a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con leche sin grasa (Santa-Cruz) al 1.5 % disuelta en TBS a 4° C toda la noche con agitación constante. Posteriormente la membrana se lavó 3 veces con 0.1 % de Tween 20 en TBS.

Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios de interés así como sus respectivos anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa diluidos en leche sin grasa al 1%. Las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T al 0.1 % antes de incubar con el anticuerpo primario. Para la detección de calpaína-10 se utilizó el anticuerpo Anti-calpain 10 antibody- Catalytic domain (Domain II)(Abcam); y Goat anti-rabbit IgG-HRP: sc-2004 (Santa Cruz) como anticuerpo secundario. Para la detección de β -actina se empleó Goat polyclonal IgG Actin (1-19): sc-1616 (Santa Cruz) y Donkey anti-goat IgG-HRP: sc-2020 (Santa Cruz).

Las bandas se detectaron por quimioluminiscencia con ECL-plus (Amersham), y las densitometrías se realizaron con el programa Quantity one 1.0.

Actividad de Calpaínas por proteólisis del sustrato fluorogénico tBOC-Leu-Met-CMAC mediante citometría de flujo

Las células tratadas con arsenito de sodio se centrifugaron por 5 min a 5000 rpm, se les retiró el medio de cultivo y se resuspendieron en el amortiguador Krebs Ringer HEPES (KRH, NaCl 115 mM, KCl 5 mM, KH_2PO_4 1mM, CaCl_2 2mM, MgSO_4 1.2 mM, HEPES 25 mM) con una concentración final de glucosa de 3.9 mM o 11.1 mM y una dilución 1:800 del sustrato tBoc-Leu-Met-CMAC (10mM en DMSO, Molecular Probes). Las células se incubaron durante 25 min a 37 °C en un baño maría y se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS. Se evaluaron 10,000 eventos por muestra en un citómetro de flujo Attune (Applied Biosystems).

Análisis estadístico

Para el análisis de los datos de citometría se empleó el software FlowJo V10. Se determinaron las ventanas para evaluar a todas las células, o solamente a células viables según se indique en los resultados. Para el análisis estadístico se obtuvieron las frecuencias celulares de cada región respecto a la ventana padre, así como la mediana de la intensidad de fluorescencia (MIF) de cada población.

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Graph Pad Prism 6. Se determinó si la distribución de los datos se ajustaba a una distribución normal

mediante las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y la de Shapiro-Wilk, dependiendo del tamaño de la muestra. En el caso de los datos distribuidos de manera normal, se les realizó un análisis de varianza (ANOVA) con pruebas post hoc según el caso (Tukey para comparaciones múltiples y Dunnet para comparar respecto al control). En el caso de los datos que no se distribuyeron de manera normal, se les realizó una prueba no paramétrica. En todas las pruebas se consideraron significativas aquellas diferencias con $p < 0.05$.

RESULTADOS

Características de los donadores

Los donadores tuvieron un índice de masa corporal (IMC) dentro del rango normal (18.5 – 24.9). Con excepción del colesterol HDL, el cual en promedio es más bajo que el valor de referencia (29.6 ± 22 vs 35 - 85 mg/dl), el resto de los parámetros se encontraron dentro de los rangos normales (Tablas 1 y 2).

Tabla 1. Características antropométricas de los individuos muestreados

| Parámetros antropométricos | |
|--------------------------------|------------------|
| n | 3 |
| Edad (años) | 24.3 ± 1.5 |
| Peso (Kg) | 64 ± 7.9 |
| Talla (m) | 1.70 ± 0.08 |
| IMC (Kg/m^2) | 22.07 ± 1.11 |

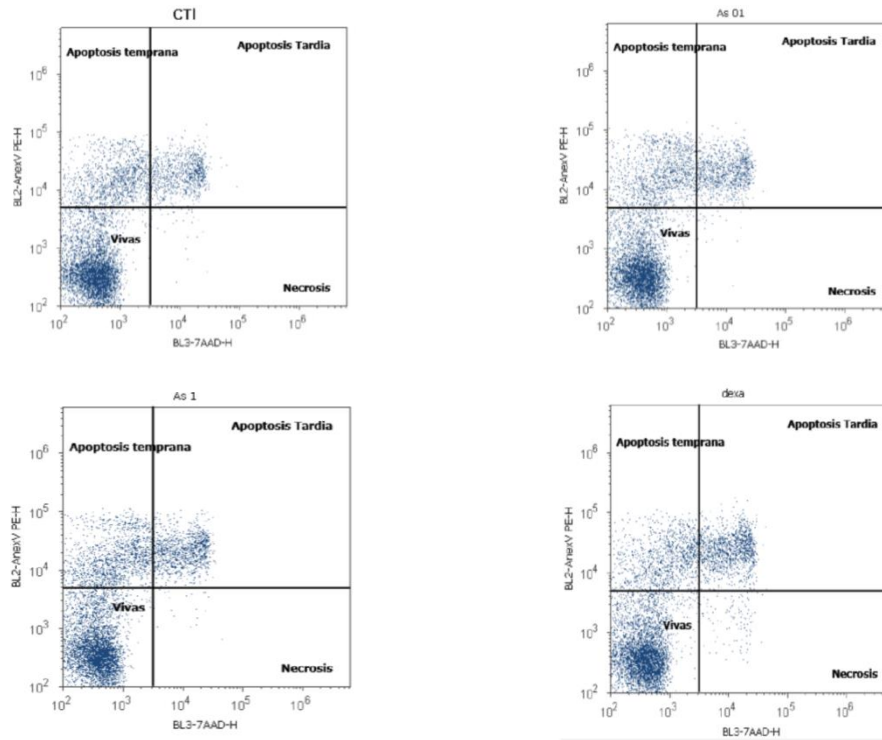
Tabla 2. Características bioquímicas de los individuos muestreados

| | Concentración (mg/dl) | Valores de referencia (mg/dl) |
|---------------|-----------------------|-------------------------------|
| Glucosa | 76 ± 3.46 | 70 - 100 |
| Triglicéridos | 104.8 ± 41.5 | <150 |
| Colesterol | 163.66 ± 35.5 | <200 |
| C-HDL | 29.6 ± 22 | 35-85 |
| C-LDL | 113.1 ± 25 | <150 |

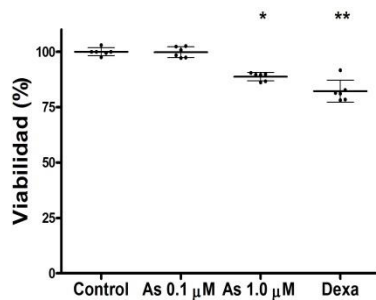
Citotoxicidad del arsenito de sodio

Al evaluar el porcentaje de células negativas tanto para Anexina V-PE (AV-PE) como para 7AAD (figura 6 a), se observó que la viabilidad celular disminuyó significativamente con la concentración de $1.0 \mu\text{M}$ de arsenito de sodio ($p < 0.05$). Esta disminución fue del 10% mientras que con el control positivo (dexametasona) fue del 20% ($p < 0.01$, figura 6 b). Además, hubo un aumento significativo de células en apoptosis temprana (células positivas para AV-PE debido a la externalización de la fosfatidil serina) con la concentración $1.0 \mu\text{M}$ de arsénico ($p < 0.05$) (figura 6 c). Por otro lado, la dexametasona indujo un incremento tanto en la apoptosis temprana como en la tardía (células positivas para AV-PE y 7AAD), indicando que además de la externalización del fosfolípido, ya existen alteraciones en la membrana celular ($p < 0.01$ y $p < 0.01$ respectivamente, figura 6 d).

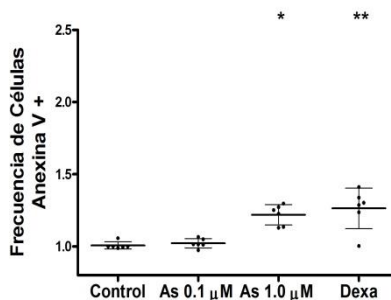
a)



b)



c)



d)

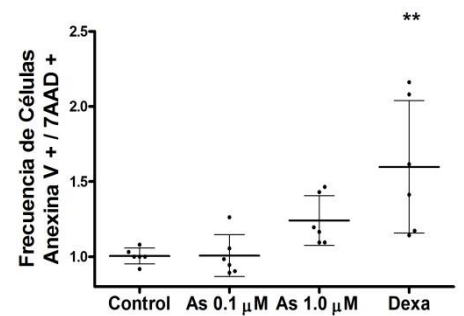


Figura 6.- Efecto de la exposición *in vitro* a arsenito por 72 h sobre la viabilidad celular y la apoptosis en linfocitos. a) Dot blots representativos de células tratadas con arsenito de sodio por 72 h y teñidas con Anexina-V-PE y 7AAD. b) Porcentaje de viabilidad, determinada por el porcentaje de células sin tinción para anexina V ni 7AAD. c) Frecuencia de apoptosis temprana medida por la frecuencia de células positivas para anexina V. d) Frecuencia de células con apoptosis tardía, determinadas por la presencia tanto de anexina V como de 7AAD. La gráfica representa las medias \pm desviación estándar de tres individuos por duplicado. Datos normalizados respecto al control. b) y c) analizados con la prueba de Kruskal-Wallis y Dunn, d) analizado por ANOVA con una prueba de Dunnet, comparaciones hechas contra el control sin arsenito * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Modulación de la expresión de calpaína-10

Al analizar la presencia de la proteína calpaína-10 mediante Western Blot, se encontró que los linfocitos en cultivo expresan principalmente tres isoformas, una cercana a los 75 kDa, otra de alrededor de 45 kDa y una de aproximadamente 35 kDa (figura 7 a).

Con la concentración de 0.1 μM de arsenito sólo la isoforma de 75 kDa presentó un ligero aumento que fue estadísticamente significativo respecto al control ($p < 0.05$, Figura 7 b). Las isoformas de 35 y 40 kDa no presentaron cambios significativos en su expresión con ninguna de las concentraciones de arsenito (figura 7 c y d).

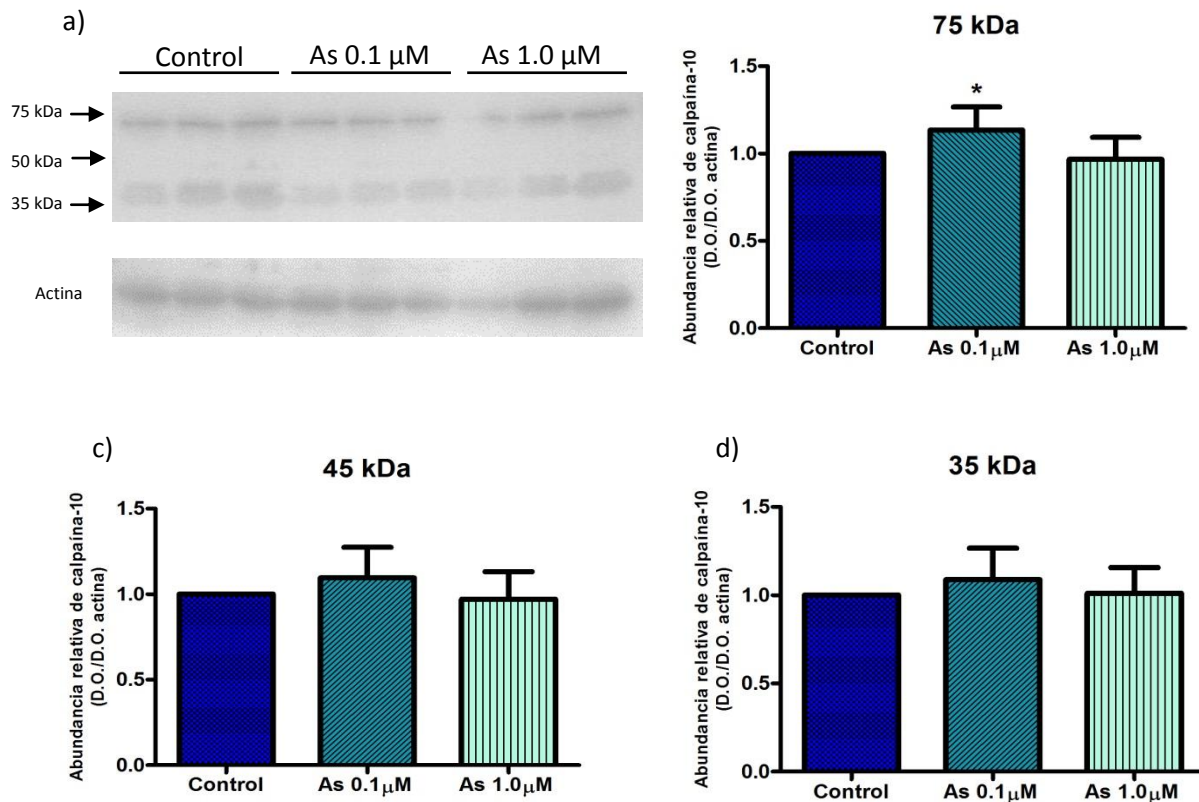


Figura 7. Determinación de la expresión de la proteína calpaína-10 en linfocitos expuestos a diferentes concentraciones de arsenito de sodio por 72 h. a) Western Blot representativo de los tres individuos. b) Expresión de la isoforma de 75 kDa. c) Expresión de la isoforma de 45 kDa. d) Expresión de la isoforma de 35 kDa. Las gráficas muestran las medias \pm desviación estándar de tres individuos por triplicado. Los datos fueron normalizados respecto a la expresión de la actina y a la expresión del control sin arsenito. Fueron analizados con ANOVA y prueba de Dunnet. * $p < 0.05$.

Actividad de calpaínas

La actividad de las calpaínas fue evaluada utilizando el sustrato fluorogénico tBoc-Leu-Met-CMAC. Este compuesto no fluorescente es capaz de permear hacia el interior de la célula, donde es conjugado con glutatión (GSH) mediante un enlace covalente con el grupo CMAC, formando un compuesto que no es permeable en la membrana plasmática y que se acumula dentro de la célula. Después de la proteólisis entre la metionina y el CMAC-GS por las calpaínas, se libera este último compuesto, el cual es capaz de emitir fluorescencia (Rosser et al., 1993).

Mediante la exclusión por la dispersión de la luz que generan las células hacia el Forward Scatter y el Side Scatter, es posible diferenciar entre los linfocitos viables y los apoptóticos (figura 8 a). Se observó que las células muertas de los donadores no emiten fluorescencia del sustrato hidrolizado, a diferencia de las células viables, las cuales emiten distintos niveles de fluorescencia dependiendo del donador (figura 8 b). Debido a las diferencias interindividuales en los niveles basales de actividad en el control sin arsenito y bajo 3.9 mM de glucosa, los datos fueron normalizados respecto a la fluorescencia de esta condición para agrupar los resultados. Sólo en las células sin tratamiento con arsenito hubo un aumento estadísticamente significativo entre la actividad de calpaínas en la condición

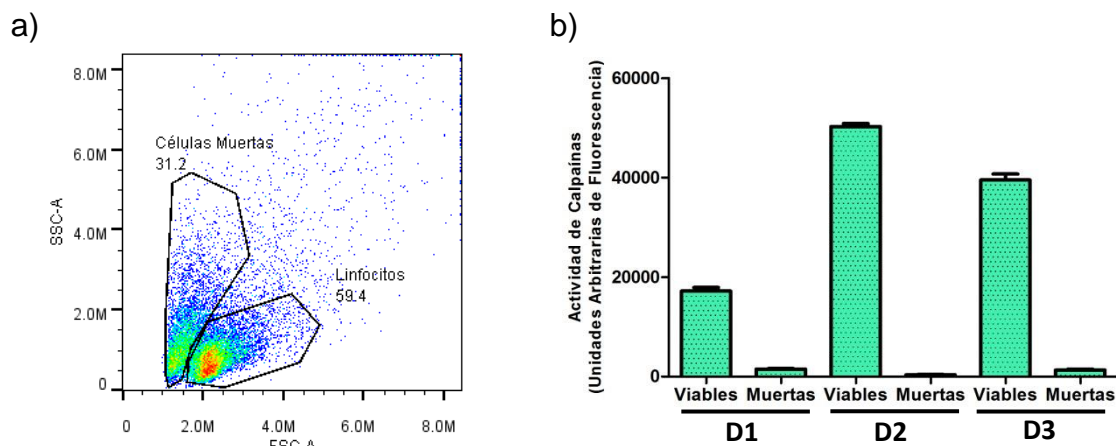


Figura 8. Actividad de calpaínas en células viables y muertas. a) Dot Blot representativo donde se puede observar la población de células muertas y la población de células viables, b) actividad de las calpaínas en los linfocitos de cada población en la concentración de 3.9 mM de glucosa en el control sin arsenito de los tres donadores. Los datos fueron ajustados tomando como referencia la autofluorescencia de células sin sustrato. Las gráficas muestran la media \pm desviación estándar de cada individuo por triplicado.

hiperglucémica (11.1 mM de glucosa, $p < 0.001$) en comparación con la actividad en la condición normoglucémica (3.9 mM de glucosa). Mientras que el tratamiento con arsenito de sodio inhibió la capacidad de las calpaínas para responder al cambio en la concentración de glucosa extracelular desde la concentración de 0.1 μM (Figura 9 b).

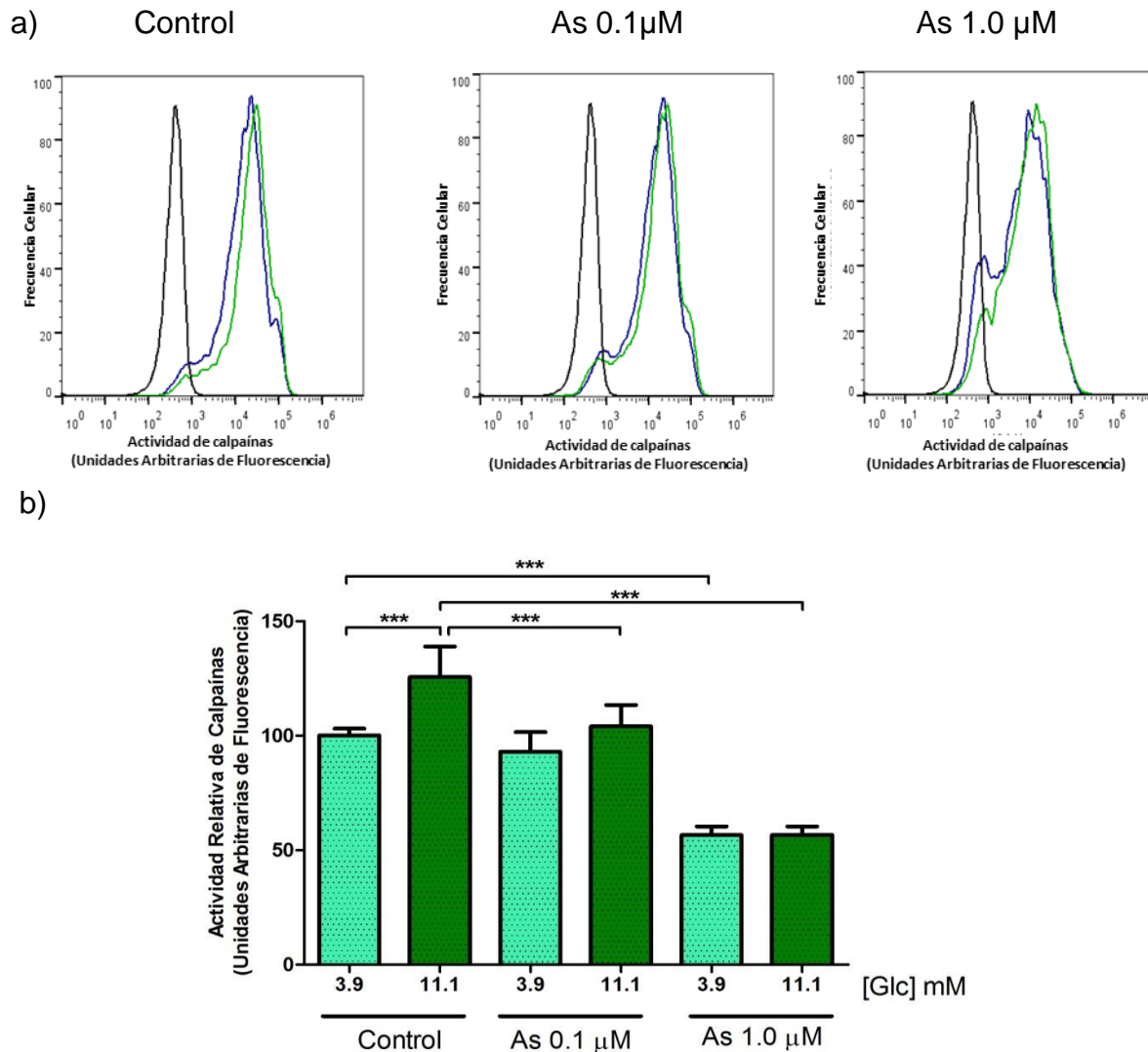


Figura 9.- Efecto de la exposición a diferentes concentraciones de arsenito de sodio durante 72 h sobre la actividad de las calpaínas en los linfocitos. a) histogramas representativos de la actividad de calpaínas en los linfocitos. En negro se muestra el control sin sustrato, azul: actividad en condiciones normoglucémicas (3.9 mM de glucosa), verde: actividad en condiciones hiperglucémicas (11.1 mM de glucosa). b) Actividad de las calpaínas en respuesta a cambios en la concentración extracelular de glucosa. Las gráficas muestran las medias \pm desviación estándar de la Mediana de la Intensidad de Fluorescencia (MIF) de los linfocitos viables de tres individuos por triplicado. Datos normalizados respecto a la actividad del control en 3.9 mM de glucosa y analizados mediante ANOVA con prueba de Tukey. *** $p < 0.001$.

Por otra parte, el tratamiento con arsenito no afectó de manera significativa la actividad basal en la condición normoglucémica (3.9 mM) de las calpaínas y sólo se detectó una disminución estadísticamente significativa con la concentración de 1.0 μ M ($p < 0.001$). Por el contrario, la actividad en la condición hiperglucémica disminuyó de forma dependiente de la concentración de arsenito ($p < 0.001$, figura 9 b).

A partir de los histogramas generados en el análisis de la población de linfocitos viables, se observó que estas células no presentaban un patrón uniforme de la actividad de calpaínas; se lograron diferenciar tres poblaciones de acuerdo a los niveles de fluorescencia del sustrato hidrolizado (figura 9 a). Por lo tanto, se analizó la actividad de los linfocitos en cada una de estas tres poblaciones separando a los linfocitos en alta, media y baja intensidad de fluorescencia del sustrato hidrolizado. Se observó que cada población de linfocitos se modula de forma diferencial.

Linfocitos con alta intensidad de fluorescencia. La cantidad de células con alta fluorescencia aumentó casi al doble en respuesta al estímulo hiperglucémico en las células control (sin tratamiento con arsenito) ($p < 0.001$). Sin embargo, el arsenito inhibió dicho incremento. Además, la población de células disminuyó al 50% en condiciones normoglucémicas con la concentración de 1.0 μ M de arsenito respecto al control ($p < 0.001$). No se observaron cambios en la intensidad de fluorescencia bajo ningún tratamiento (Figura 10 a y b).

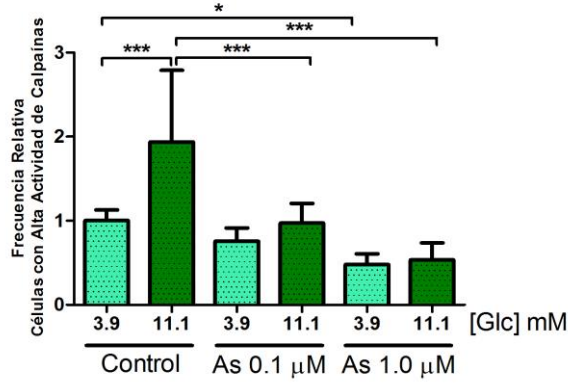
Linfocitos con media intensidad de fluorescencia. En este grupo se encuentra el mayor porcentaje de células. Esta población de células presentó cambios principalmente en la intensidad de fluorescencia, sin afectar la frecuencia de células. A diferencia del análisis que considera a todas las poblaciones de linfocitos, se detectó un aumento significativo de la intensidad de fluorescencia en la condición hiperglucémica respecto a la normoglucémica en las células expuestas a 0.1 μ M de arsenito ($p < 0.01$), pero el incremento fue menor que el observado en el control ($p < 0.001$). En las células expuestas a 1.0 μ M de arsenito no se detectaron diferencias en la fluorescencia entre las dos concentraciones de

glucosa y presentaron una menor intensidad de fluorescencia respecto al control ($p < 0.001$, figura 10 c y d), tal y como se observaba en el análisis que considera a toda la población de linfocitos viables.

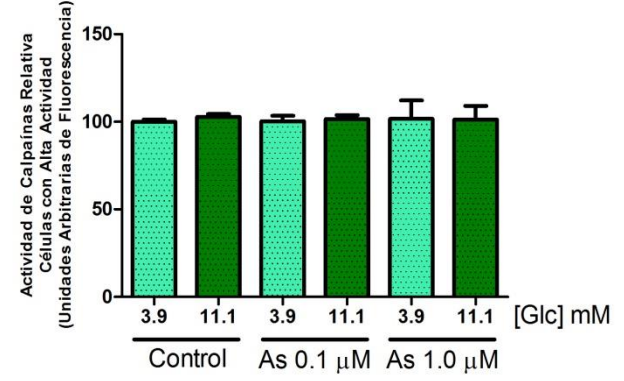
Linfocitos con baja intensidad de fluorescencia. Se observó que al igual que en la población de mayor actividad, no se generaron cambios en la intensidad de fluorescencia, sin embargo, en los linfocitos expuestos a la concentración de arsenito más alta, la frecuencia de células aumentó casi al doble en ambas condiciones de glucosa con respecto al control ($p < 0.001$, $p < 0.01$ respectivamente, figura 10 e y f). Además, cabe destacar que esta población no responde a cambios en la concentración de glucosa extracelular.

Figura 10. Efecto de la exposición a arsenito de sodio sobre distintas poblaciones de linfocitos de acuerdo a su nivel de actividad de calpaínas. a), c), e) Frecuencia de células en las regiones de alta, intermedia y baja actividad respectivamente. b), d) y f) Mediana de la Intensidad de Fluorescencia (MIF) de las regiones de alta, intermedia y baja actividad respectivamente. Las gráficas muestran la media \pm desviación estándar de tres individuos por triplicado. Datos normalizados respecto al control en 3.9 mM de glucosa y analizados mediante ANOVA con prueba de Tukey. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

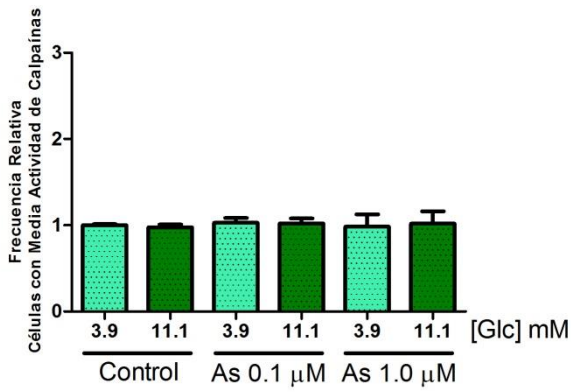
a)



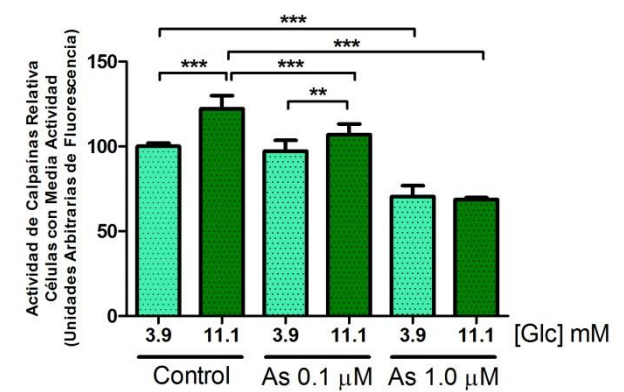
b)



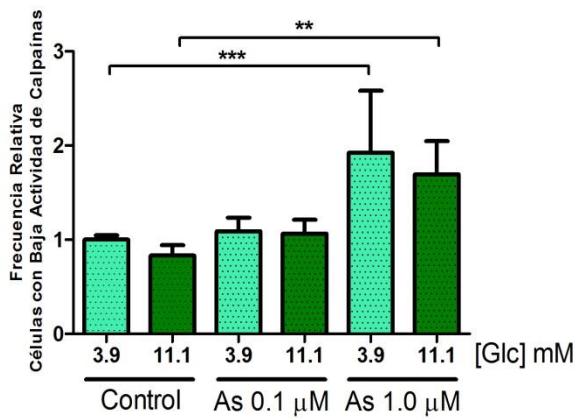
c)



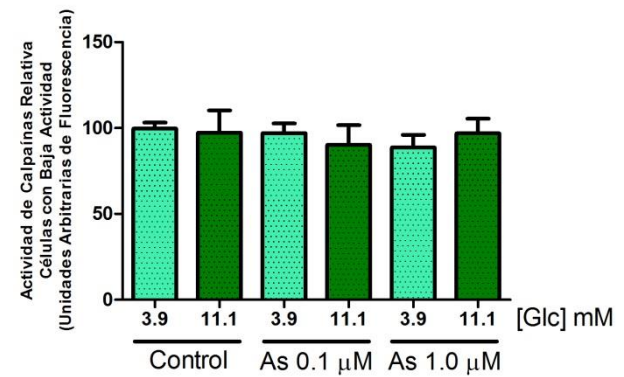
d)



e)



f)



DISCUSIÓN

En los últimos años la DM2 se ha convertido en uno de los principales problemas de salud a nivel mundial. Si bien el aumento en su prevalencia se ha asociado principalmente a cambios en el estilo de vida, la exposición a contaminantes ambientales, como el arsénico, también podrían tener un papel relevante en el desarrollo de esta enfermedad (Díaz-Villaseñor et al., 2013).

Diversos estudios epidemiológicos han mostrado que la exposición a arsénico en el agua está asociada a un mayor riesgo de desarrollar DM2. Existen diversos estudios que han evaluado los efectos de este metaloide sobre la funcionalidad y la citotoxicidad de la célula β , sin embargo, los estudios sobre las alteraciones que pudiera generar en tejidos periféricos son escasos, aun cuando se ha propuesto que la inhibición de la absorción de glucosa por el arsénico podría ser el principal mecanismo por el cual la exposición crónica a este metaloide induce DM2 (Huang et al., 2011).

En este estudio se observó que las concentraciones de arsenito utilizadas no indujeron una disminución importante en la viabilidad celular. Hallazgos similares en relación a la citotoxicidad del arsenito con estas concentraciones son reportados en otros estudios con linfocitos, células β y adipocitos (Vega et al., 1999; Díaz-Villaseñor et al., 2008; Walton et al., 2004). En nuestro estudio, la disminución del 10% en la viabilidad celular observada con la concentración más alta de arsenito (1.0 μ M) fue generada principalmente por el aumento de células en apoptosis temprana. Estos datos indican que las concentraciones utilizadas no resultaron citotóxicas y que por tanto, los efectos observados no son resultado de la inducción de mecanismos de muerte celular.

Respecto a la expresión de la proteína calpaína-10, el arsenito sólo fue capaz de generar un ligero aumento en la expresión de la isoforma de 75 KDa con la concentración de 0.1 μ M, la cual pudo ser debida a mecanismos compensatorios. Sin embargo, estudios previos muestran que la expresión de la proteína de calpaína-10 no es afectada en células β expuestas a distintas concentraciones de

arsenito, aun cuando indujo un aumento en la expresión del mRNA con la máxima concentración probada en dicho estudio (Díaz-Villaseñor et al., 2008). Además, se ha observado que la expresión de esta proteína tampoco disminuye ni en el músculo esquelético ni en los linfocitos de pacientes con DM2 (Norton et al., 2008, Díaz-Villaseñor et al., 2008), lo cual sugiere que los niveles de esta proteína no son afectados por diversos factores ambientales, y que la regulación de su actividad podría jugar un papel importante en el desarrollo de la DM2.

La actividad de las calpaínas en condiciones normoglucémicas fue afectada por la concentración de 1.0 μM de arsenito. Esta disminución podría estar relacionada con la disminución en los niveles de glutatión (GSH, el cual es necesario para evitar que el producto hidrolizado difunda fuera de la célula) por el estrés oxidativo que induce este metaloide. Sin embargo, diversos trabajos han mostrado que la exposición a concentraciones de 1 y 2 μM de especies trivalentes de arsénico por 24 horas induce un aumento en los niveles de GSH intracelular tanto en células hepáticas, como en células uroteliales (Li et al., 2011; Wang et al., 2013), pero sólo se ha observado una disminución de GSH con concentraciones mayores a 5 μM (Catalayud et al., 2013). Por lo tanto, pensamos que la disminución en la actividad de las calpaínas observada en la población de células viables tratadas con 1.0 μM de arsénico, podría no ser debida a una disminución de los niveles de GSH; una perspectiva interesante será conocer el efecto en los niveles de GSH después de 72 horas de tratamiento en nuestro sistema.

Además, se observó que el arsenito es capaz de inhibir la respuesta de las calpaínas al cambio en la concentración extracelular de glucosa desde la concentración de 0.1 μM de arsenito. Lo cual sugiere que la exposición a este metaloide es capaz de inhibir la respuesta sin alterar la actividad basal de las calpaínas en el linfocito ni la expresión de la calpaína-10, de manera similar a lo que se observa en linfocitos de individuos diabéticos (Díaz-Villaseñor et al., 2008). Sin embargo, aún no se ha determinado el papel de la calpaína-10 en la actividad de las calpaínas en respuesta a cambios en la concentración extracelular de glucosa.

Las calpaínas pueden ser activadas a través de diversos mecanismos. Si bien, el más importante es la unión a calcio, también se ha observado que las calpaínas son reguladas a través de fosforilaciones, unión a fosfolípidos y su localización intracelular (Ono et al., 2012; Sorimachi et al., 2012; Franco et al., 2005). Por lo tanto, la inhibición en la capacidad de respuesta y en la actividad basal de las calpaínas podría deberse a la alteración de cualquiera de estos factores. En este sentido, se ha observado que el arsenito es capaz de inhibir las fluctuaciones en los niveles de calcio en respuesta a cambios en la concentración extracelular de glucosa en células β pancreáticas tratadas con 0.5 μ M de arsenito por 72 h (Díaz-Villaseñor et al., 2008). Sin embargo, estudios hechos en linfocitos murinos muestran que la exposición a arsenito de sodio por 24 h induce el aumento en la concentración de calcio intracelular aún en células quiescentes (Goytia-Acevedo et al., 2003), lo cual conllevaría a una mayor activación de las calpaínas.

Además de la alteración en la concentración de calcio intracelular, el arsénico es capaz de modular distintas cinasas de proteína como ERK y Akt (Xue et al., 2011; Wen et al., 2010; Alp et al., 2010) que tienen la capacidad de regular a las calpaínas a través de la fosforilación en residuos de serina y treonina ubicados en los dominios CysPC y C2L (Franco et al., 2005). Finalmente, diversos trabajos han demostrado que las especies trivalentes de arsénico, tales como el arsenito empleado en este estudio, son capaces de unirse y formar complejos con los grupos tiol de las cisteínas en las proteínas (Alp et al., 2010; Ngu et al., 2006; Guo et al., 2005). Dado que las calpaínas son proteasas cuyo residuo catalítico es una cisteína, el arsénico podría inhibir su actividad catalítica mediante su unión al sitio activo.

Debido a que las calpaínas, y en particular la calpaína-10, han sido involucradas en la externalización de los transportadores de glucosa (Paul et al., 2003), la inhibición de la capacidad para responder al cambio en la concentración extracelular de glucosa podría ocasionar una disminución en la externalización de los transportadores de glucosa. Alteraciones de este tipo han sido observadas en linfocitos de donadores diabéticos, los cuales expresan menor cantidad de GLUT3,

así como en linfocitos expuestos a un ambiente hiperglucémico, en los que disminuye la abundancia de GLUT3 y GLUT4 en la membrana plasmática, aun cuando la expresión global de GLUT4 es aumentada y la de GLUT3 no presenta modificaciones (Kipmen-Korgun et al., 2009; Oleszczak et al., 2012). Por lo cual, la inhibición de las calpaínas podría contribuir a la menor captación de glucosa en tejidos periféricos, lo que ha sido previamente observado en adipocitos y en ratas (Huang et al., 2011). Además, se ha propuesto que la incapacidad para externalizar a estos transportadores contribuye a la susceptibilidad de adquirir infecciones que se presentan en los individuos diabéticos, pues el aumento en el consumo de glucosa es necesario para mantener la alta actividad metabólica que presentan los linfocitos activados que deben de sintetizar DNA, citocinas entre otros factores (Oleszczak et al., 2012; Kipmen-Korgun et al., 2009; Jacobs et al., 2008; Moriguchi et al., 1998). Por otra parte, la inhibición de la actividad basal de las calpaínas en el linfocito podría contribuir a una menor capacidad de estas células para montar una respuesta inmune, pues las calpaínas participan en procesos relacionados a la migración de estas células (Mikosik et al., 2013).

De manera interesante, se encontró que existen tres poblaciones de linfocitos que presentan diferentes niveles de actividad y que responden de manera diferencial tanto a la glucosa como al arsenito. Recientemente, se ha reportado que las distintas poblaciones de linfocitos expresan de manera diferencial a los miembros del sistema de las calpaínas. Los linfocitos T CD8⁺ presentan la mayor expresión de calpaína-1, calpaína-2 y calpastatina, seguidos por los linfocitos T CD4⁺ y B CD19⁺ (Mikosik et al., 2013), sin embargo, no existen datos referentes a los diferentes grados de actividad de las calpaínas en estas poblaciones celulares. Nuestros datos sugieren que la respuesta al cambio en la concentración extracelular de glucosa se da principalmente en las células con media y alta actividad. Estas diferencias en la respuesta a la glucosa podrían deberse a que cada población corresponde a células con diferentes grados de actividad metabólica. Trabajos previos muestran que existen diferencias en la captación de glucosa y en los cambios de expresión de los GLUTs generados por ambientes hipo e hiperglucémicos entre linfocitos T y B (Oleszczak et al., 2012). Además la

calpaína-10 ha sido involucrada de manera importante en la regulación del metabolismo celular, debido a su papel en la externalización del transportador de glucosa GLUT4 y en la homeostasis de los complejos de la cadena respiratoria en la mitocondria (Paul et al., 2003; Brown et al., 2007; Arrington et al., 2006). Por lo tanto, las calpaínas podrían jugar un papel importante en el metabolismo de los linfocitos, sin embargo, su papel en estas células no ha sido determinado.

En relación a la exposición al arsenito, se encontró que la disminución en los niveles de actividad fue principalmente por el aumento de la frecuencia de células con bajos niveles de actividad. Además, respecto a la capacidad de responder a los cambios de glucosa, se pudo observar que la concentración más baja de arsenito suprimió por completo la respuesta de las células con mayor actividad, mientras que aquellas con niveles intermedios de actividad aún presentaban la capacidad de responder, aunque significativamente menos que el control. Esto sugiere que el arsenito inhibe la actividad de las calpaínas diferencialmente en las diferentes poblaciones de linfocitos. En concordancia con esto, se ha observado que el arsenito aumenta de manera significativa los niveles de calcio en linfocitos estimulados con fitohemaglutinina (PHA), mientras que no tiene efectos significativos en aquellos estimulados con concanavalina A, lo cual correlaciona con una menor proliferación en aquellos estimulados con PHA y arsenito (Goytia-Acevedo et al., 2003).

En resumen, este trabajo aporta información que permite entender cómo el arsénico altera procesos relacionados con la homeostasis de la glucosa, evidenciando que este metaloide es capaz de inhibir la capacidad de las calpaínas en el linfocito para responder a cambios extracelulares de glucosa.

CONCLUSIÓN

En este estudio se encontró que concentraciones no citotóxicas de arsenito fueron capaces de inhibir la respuesta de las calpaínas en el linfocito a cambios en la concentración extracelular de glucosa, sin alterar la expresión de calpaína-10. Esto podría contribuir a la alteración de la homeostasis de la glucosa, y por tanto a un mayor riesgo de desarrollar DM2

Además, se encontró que dentro de los linfocitos existen tres poblaciones celulares dependiendo de los niveles de actividad de las calpaínas que presentan, y cada una de estas poblaciones es regulada de manera diferencial tanto por la glucosa como por el arsenito.

REFERENCIAS

- Alp O., Merino E., Caruso J. 2010. "Arsenic-induced protein phosphorylation changes in HeLa cells." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398: 2099–2107.
- American Diabetes Association. 2012. "Diagnosis and classification of diabetes mellitus." *Diabetes Care* 35 Suppl 1: S64–S71.
- Aposhian H., Aposhian M. 2006. "Arsenic toxicology: five questions". *Chemical Research Toxicology*. 19:1-15.
- Arrington D., Van Vleet T., Schnellmann R. 2006. "Calpain 10: a mitochondrial calpain and its role in calcium-induced mitochondrial dysfunction." *American Journal of Physiology Cell Physiology* 291: C1159–C1171.
- Baier L., Permana P., Yang X., Pratley R., Hanson R., Shen G., Mott D, Knowler W., Cox N., Horikawa Y., Oda N., Bell G., Bogardus C. 2000. "A calpain-10 gene polymorphism is associated with reduced muscle mRNA levels and insulin resistance." *The Journal of Clinical Investigation* 106: 69–73.
- Balasubramanyam M., Premanand C., Mohan V. 2002. "The Lymphocyte as a Cellular Model to Study Insights into the Pathophysiology of Diabetes." *Annals New York Academy of Sciences* 958: 399–402.
- Bolt H. 2012. "Arsenic: an ancient toxicant of continuous public health impact, from Iceman Ötzi until now." *Archives of Toxicology* 86: 825–830.
- Brown A., Yeaman S., Walker M. 2007. "Targeted suppression of calpain-10 expression impairs insulin-stimulated glucose uptake in cultured primary human skeletal muscle cells." *Molecular Genetics and Metabolism* 91: 318–324.
- Bundschuh J., Litter M., Parvez F., Román-Ross G., Nicolli H., Jean J., Liu C., López D., Armienta M., Guilherme L., Gomez Cuevas A, Cornejo L, Cumbal L., Toujaguez R. 2012. "One century of arsenic exposure in Latin America: a review of history and occurrence from 14 countries." *The Science of the Total Environment* 429: 2–35.
- Calatayud M., Devesa V., Vélez D. 2013. "Differential toxicity and gene expression in Caco-2 cells exposed to arsenic species." *Toxicology Letters* 218: 70–80.
- Chakrabarti R, Jung C., Lee T., Liu H., Mookerjee B. 1994. "Changes in glucose transport and transporter isoforms during the activation of human peripheral blood lymphocytes by phytohemagglutinin." *Journal of Immunology*: 2660–2668.
- Covington M., Schnellmann R. 2012. "Chronic high glucose downregulates mitochondrial calpain 10 and contributes to renal cell death and diabetes-induced renal injury." *Kidney International* 81: 391–400.

- Covington M., Arrington D., Schnellmann R. 2009. "Calpain 10 is required for cell viability and is decreased in the aging kidney." *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 296: F478–F486.
- Del Razo L., García-Vargas G., Valenzuela O., Hernández Castellanos E., Sánchez-Peña L., Currier J., Drobná Z., Loomis D., Stýblo M. 2011. "Exposure to arsenic in drinking water is associated with increased prevalence of diabetes: a cross-sectional study in the Zimapán and Lagunera regions in Mexico." *Environmental Health* 10: 1–11.
- Diamond J. 2003. "The double puzzle of diabetes." *Nature* 423: 599–602.
- Díaz-Villaseñor A., Burns A., Salazar A., Sordo M., Hiriart M., Cebrián M., Ostrosky-Wegman P. 2008. "Arsenite reduces insulin secretion in rat pancreatic β -cells by decreasing the calcium-dependent calpain-10 proteolysis of SNAP-25." *Toxicology and Applied Pharmacology* 231: 291 – 299.
- Díaz-Villaseñor A., Cruz L., Cebrián A., Hernández-Ramírez R., Hiriart M., García-Vargas G., Bassol S., Sordo M., Gandolfi J., Klimecki W., López-Carillo L., Cebrián M., Ostrosky-Wegman P. 2013. "Arsenic exposure and calpain-10 polymorphisms impair the function of pancreatic beta-cells in humans: a pilot study of risk factors for T2DM." *PLoS one* 8(1): e51642.
- Díaz-Villaseñor A., Sánchez-Soto M., Cebrián M., Ostrosky-Wegman P., Hiriart M. 2006. "Sodium arsenite impairs insulin secretion and transcription in pancreatic beta-cells." *Toxicology and Applied Pharmacology* 214: 30–34.
- Díaz-Villaseñor A., Hiriart M., Cebrián M., Zacarías-Castillo R., Ostrosky-Wegman P. 2008. "The activity of calpains in lymphocytes is glucose-dependent and is decreased in diabetic patients." *Blood Cells, Molecules & Diseases* 40: 414–419.
- Dimitriadis G., Maratou E., Boutati E., Psarra K., Papasteriades C., Raptis S. 2005. "Evaluation of glucose transport and its regulation by insulin in human monocytes using flow cytometry." *Cytometry. Part A* 64: 27–33.
- Franco S., Huttenlocher A. 2005. "Regulating cell migration: calpains make the cut." *Journal of Cell Science* 118: 3829–3838.
- Galicia G., Leyva R., Tenorio E., Ostrosky-Wegman P., Saavedra R. 2003. "Sodium arsenite retards proliferation of PHA-activated T cells by delaying the production and secretion of IL-2." *International Immunopharmacology* 3: 671–682.
- Garelick H., Jones H., Dybowska A., Valsami-Jones E. 2008. "Arsenic pollution sources." *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 197:17-60.

- Gentry P., McDonald T., Sullivan D., Shipp A., Yager J., Clewell H. 2010 “3rd. Analysis of genomic dose-response information on arsenic to inform key events in a mode of action for carcinogenicity”. *Environmental Molecular Mutagenesis* 51:1-14.
- Giguere C., Covington M., Schnellmann R. 2008. “Mitochondrial calpain 10 activity and expression in the kidney of multiple species.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 366: 258–262.
- Goodman D., Isakson P. 1993. “Mitogen activation of resting lymphocytes exposes cryptic insulin receptors.” *Journal of Biological Chemistry* 268:4207–4215.
- Goytia-Acevedo R., Cebrian M., Calderon-Aranda E. 2003. “Differential effects of arsenic on intracellular free calcium levels and the proliferative response of murine mitogen-stimulated lymphocytes.” *Toxicology* 189: 235–244.
- Green R., Lewis B., Hillman R., Blanchette M., Lareau L., Garnett A., Rio D., Brenner S. 2003. “Widespread predicted nonsense-mediated mRNA decay of alternatively-spliced transcripts of human normal and disease genes.” *Bioinformatics* 19(Suppl 1): i118–i121.
- Guo Y., Ling Y., Thomson B., Siu K. 2005. “Combined ion-mobility and mass-spectrometry investigations of metallothionein complexes using a tandem mass spectrometer with a segmented second quadrupole.” *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 16: 1787–1794.
- Horikawa Y., Oda N., Cox N., Li X., Orho-Melander M., Hara M., Hinokio Y., Lindner T., Mashima H., Schwarz P., del Bosque-Plata L., Oda Y., Yoshiuchi I., Colilla S., Polonsky K., Wei S., Concannon P., Iwasaki N., Schulze J., Baier L., Bogardus C., Groop L., Boerwinkle E., Hanis C., Bell G. 2000. “Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus.” *Nature Genetics* 26: 163–175.
- Huang C., Chen Y., Yang C., Tsai K., Yang R., Liu S. 2011. “Arsenic and diabetes: current perspectives.” *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences* 27: 402–410.
- Huang Y., Wang K. 2001. “The calpain family and human disease.” *Trends in Molecular Medicine* 7: 355–362.
- Islam R., Khan I., Hassan S., McEvoy M., D’Este C., Attia J., Peel R., Sultana M., Akter S., Milton A. 2012. “Association between type 2 diabetes and chronic arsenic exposure in drinking water: a cross sectional study in Bangladesh.” *Environmental Health* 11: 2–8.
- Jacobs S., Herman C., Maciver N., Wofford J., Wieman H., Hammen J., Rathmell J. 2008. “Glucose uptake is limiting in T cell activation and requires CD28-mediated Akt-dependent and independent pathways.” *Journal of Immunology* 180: 4476–4486.

- Johnson J., Han Z., Otani K., Ye H., Zhang Y., Wu H., Horikawa Y., Misler S., Bell G., Polonsky K. 2004. "RyR2 and calpain-10 delineate a novel apoptosis pathway in pancreatic islets." *The Journal of Biological Chemistry* 279: 24794–24802.
- Kaput J., Kevin D. 2007. "Complexity of type 2 diabetes mellitus data sets emerging from nutrigenomic research: A case for dimensionality reduction?" *Mutation Research* 622: 19–32.
- Kipmen-Korgun D., Bilmen-Sarikcioglu S., Altunbas H., Demir R., Korgun E. 2009. "Type-2 diabetes down-regulates glucose transporter proteins and genes of the human blood leukocytes." *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 69: 350–358.
- Kitchin KT. 2001 "Recent advances in arsenic carcinogenesis: modes of action, animal model systems, and methylated arsenic metabolites." *Toxicology Applied Pharmacology* 172:249-261.
- Li B., Li X., Zhu B., Zhang X., Wang Y., Xu Y., Wang H., Hou Y., Zheng Q., Sun G. 2011. "Sodium arsenite induced reactive oxygen species generation , nuclear factor (erythroid-2 related) factor 2 activation , heme oxygenase-1 expression , and glutathione elevation in Chang human hepatocytes." *Environmental Toxicology*: 1–10.
- Liu Z., Styblo M., Rosen B.. Methylarsonous acid transport by aquaglyceroporins. 2006 *Environmental Health Perspectives*. 114:527-531.
- Lu T., Xu Y., Mericle M., Mellgren R. 2002. "Participation of the conventional calpains in apoptosis." *Biochimica et Biophysica Acta* 1590: 16–26.
- Lynn S., Evans J., White C., Frayling T., Hattersley A., Turnbull D., Horikawa Y., Cox N., Bell G., Walker M. 2002. "Variation in the calpain-10 gene affects blood glucose levels in the British population." *Diabetes* 51: 247–250.
- Maratou E, Dimitriadis G, Kollias A, et al. 2007. "Glucose transporter expression on the plasma membrane of resting and activated white blood cells." *European Journal of Clinical Investigation* 37:282–290
- Marshall C., Hitman G, Partridge C., Clark A., Ma H., Shearer T., Turner M. 2005. "Evidence that an isoform of calpain-10 is a regulator of exocytosis in pancreatic beta-cells." *Molecular Endocrinology* 19: 213–224.
- Marx J. 2002. "Unraveling the causes of diabetes." *Science* 296: 686–689.
- Mendoza-Lorenzo P., Salazar A., Cortes-Arenas E., Saucedo R., Taja-Chayeb L., Flores-Dorantes M., Pánico P., Sordo M., Ostrosky-Wegman P. 2013. "The reduction of Calpain-10 expression is associated with risk polymorphisms in obese children." *Gene* 516: 126–131.

- Mikosik A, Foerster J, Jasiulewicz A. 2013. "Expression of calpain-calpastatin system (CCS) member proteins in human lymphocytes of young and elderly individuals; pilot baseline data for the CALPACENT project." *Immunity and Ageing* 10: 27
- Mitchell E., Frisbie S., Sarkar B.. 2011. "Exposure to multiple metals from groundwater-a global crisis: geology, climate change, health effects, testing, and mitigation." *Metallomics* 3: 874–908.
- Moriguchi S., Kato M., Sakai K., Yamamoto S., Shimizu E. 1998. "Decreased mitogen response of splenic lymphocytes in obese Zucker rats is associated with the decreased expression of GLUT1" *The American Journal of Clinical Nutrition* 67: 1124–1129.
- Morii T., Ohno Y., Hirose H., et al. 2005. "Cellular insulin resistance in Epstein-Barr virus-transformed lymphoblasts from young insulin-resistant Japanese men". *Metabolism* 54:370-375
- Ngu T., Stillman M. 2006. "Arsenic binding to human metallothionein." *Journal of the American Chemical Society* 128: 12473–12483.
- Norton L., Parr T., Chokkalingam K., Bardsley R., Ye H., Bell G., Pelsers M., van Loon L., Tsintzas K. 2008. "Calpain-10 gene and protein expression in human skeletal muscle: effect of acute lipid-induced insulin resistance and type 2 diabetes." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 93: 992–998.
- Oleszczak B., Szablewski L., Pliszka M. 2012. "The effect of hyperglycemia and hypoglycemia on glucose transport and expression of glucose transporters in human lymphocytes B and T: an in vitro study." *Diabetes Research and Clinical Practice* 96: 170–178.
- Ono Y., Sorimachi H. 2012. "Calpains: an elaborate proteolytic system." *Biochimica et Biophysica Acta* 1824: 224–236.
- Otleř S., Cađindi O. 2010. "Health importance of arsenic in drinking water and food." *Environmental Geochemistry and Health* 32: 367–371.
- Palacios J., Roman D., Cifuentes F. 2012. "Exposure to low level of arsenic and lead in drinking water from Antofagasta city induces gender differences in glucose homeostasis in rats." *Biological Trace Element Research* 148: 224–231.
- Paul D., Harmon A., Winston C., Patel Y. 2003. "Calpain facilitates GLUT4 vesicle translocation during insulin-stimulated glucose uptake in adipocytes." *The Biochemical Journal* 376: 625–632.
- Paul D., Walton F., Saunders R., Stýblo M. 2011. "Characterization of the impaired glucose homeostasis produced in C57BL/6 mice by chronic exposure to arsenic and high-fat diet." *Environmental Health Perspectives* 119: 1104–1109.

- Perez-Martinez P., Delgado-Lista J., Garcia-Rios A., Ferguson J., Gulseth H., Blaak E., Helal O., Malczewska-Malec M., Williams C., Karlstro B., Saris W., Lovegrove J., Drevon C., Roche H., Defoort C., Rise U., Lopez-Miranda J. 2011. "Calpain-10 interacts with plasma saturated fatty acid concentrations to influence insulin resistance in individuals with the metabolic syndrome." *American Journal of Clinical Nutrition* 93: 1136–1141.
- Petersen K., Shulman G. 2006. "Etiology of insulin resistance." *American Journal of Medicine* 119(Suppl 1): 1–13.
- Piatkiewicz P., Czech A., Tatoń J. 2007. "Glucose transport in human peripheral blood lymphocytes influenced by type 2 diabetes mellitus." *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 55: 119–126.
- Platanias L. 2009. "Biological responses to arsenic compounds." *The Journal of Biological Chemistry* 284: 18583–18587.
- Rosser B., Powers P., Gores G. 1993. "Calpain activity increases in hepatocytes following addition of ATP. Demonstration by a novel fluorescent approach." *The Journal of Biological Chemistry* 268: 23593–23600.
- Rull J., Aguilar-Salinas C., Rojas R., Rios-Torres J., Gómez-Pérez F., Olaiz G. 2005. "Epidemiology of type 2 diabetes in Mexico." *Archives of Medical Research* 36: 188–196.
- Sato Y., Kuwajima M., Kamiya H., Harashima H. 2003. "Calpain 10 as a predictive gene for type 2 diabetes: evidence from a novel screening system using white blood cells of Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats." *Biological Pharmaceutical Bulletin* 26: 1765–68.
- Smith M., Schnellmann R. 2012. "Calpains, mitochondria, and apoptosis." *Cardiovascular Research* 96: 32–37.
- Sorimachi H., Mamitsuka H., Ono Y. 2012. "Understanding the substrate specificity of conventional calpains." *Biological Chemistry* 393: 853–871.
- Sorimachi H., Hata S., Ono Y. 2011. "Calpain chronicle—an enzyme family under multidisciplinary characterization." *Proceedings of the Japan Academy, Series B* 87: 287–327.
- Suriyo T., Watcharasit P., Thiantanawat A., Satayavivad J. 2012. "Arsenite promotes apoptosis and dysfunction in microvascular endothelial cells via an alteration of intracellular calcium homeostasis." *Toxicology in vitro* 26: 386–395.

- Syblo M., Drobna Z., Jaspers I., Lin S., Thomas D. 2002. "The role of biomethylation in toxicity and carcinogenicity of arsenic: a research update." *Environmental Health Perspective* 110 Suppl 5:767-771.
- Takahashi H., Cambiaghi T., Luchessi A., Hirabara S., Ramirez Vinolo M., Newsholme P., Curi R. 2012. "Activation of survival and apoptotic signaling pathways in lymphocytes exposed to palmitic acid." *Journal of Cellular Physiology* 227: 339–350.
- Torres-Avila M., Leal-Galicia P., Sanchez-Pena L., Del Razo L., Gonsebatt M. 2010. "Arsenite induces aquaglyceroporin 9 expression in murine livers." *Environmental Research* 110:443-447.
- U.S. Department of Health and Human Services. 2007. "Toxicological profile for arsenic." (August).
- Vega L., Ostrosky-wegman P., Fortoul T., Diaz C., Madrid V., Saavedra R. 1999. "Sodium arsenite reduces proliferation of human activated T-cells by inhibition of the secretion of Interleukine-2." *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 21: 203–220.
- Walton F., Harmon A., Paul D., Drobná Z., Patel Y., Styblo M. 2004. "Inhibition of insulin-dependent glucose uptake by trivalent arsenicals: possible mechanism of arsenic-induced diabetes." *Toxicology and Applied Pharmacology* 198: 424–433.
- Wang H., Xi S., Xu Y., Wang F., Zheng Y., Li B., Li X., Zheng Q., Sun G. 2013. "Sodium arsenite induces cyclooxygenase-2 expression in human uroepithelial cells through MAPK pathway activation and reactive oxygen species induction." *Toxicology in vitro* 27: 1043–1048.
- Wen G., Hong M., Calaf G., Roy D., Partridge M., Li B., Hei T. 2010. "Phosphoproteomic profiling of arsenite-treated human small airway epithelial cells." *Oncology Reports* 23: 405–412.
- Wlodkowic D., Skommer J., Darzynkiewicz Z. 2012. "Cytometry of apoptosis. Historical perspective and new advances." *Experimental Oncology* 34: 255–262.
- Xue P., Hou Y., Zhang Q., Woods C., Yarborough K., Liu H., Sun G., Andersen M., Pi J. 2011. "Prolonged inorganic arsenite exposure suppresses insulin-stimulated AKT S473 phosphorylation and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes: involvement of the adaptive antioxidant response." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 407: 360–365.
- Yang X., Pratley R., Baier L., Horikawa Y., Bell G., Bogardus C., Permana P. 2001. "Reduced skeletal muscle calpain-10 transcript level is due to a cumulative decrease in major isoforms." *Molecular Genetics and Metabolism* 73: 111–113.

Zhou X., Wang Y., Zhang Y., Gao P., Zhu D. 2010. "Association of CAPN10 gene with insulin sensitivity, glucose tolerance and renal function in essential hypertensive patients." *Clinica Chimica Acta* 411: 1126–1131.