



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE mRNAs DE
CALPAÍNA 10 EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA
EN RESPUESTA A LA ELEVACIÓN DE GLUCOSA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

Luis Manuel Arratia Cortés



DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Ana Victoria Vega Salcedo

Los Reyes Iztacala, Edo. de México, 2014



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.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	4
2. ANTECEDENTES	5
2.1. Generalidades	5
2.2. Estructura y clasificación	6
2.2.1. Calpaínas típicas	6
2.2.2. Calpaínas atípicas	7
2.3. Función y relación con enfermedades	11
2.3.1. Alzheimer	11
2.3.2. Huntington	12
2.3.3. Parkinson	13
2.3.4. Distrofias	13
2.3.5. Cataratas	13
2.3.6. Cáncer	14
2.3.7. Otras enfermedades	14
2.4. CALPAÍNA 10 Y DIABETES	15
2.5. ¿PODRÍA ESTAR LA CALPAÍNA 10 RELACIONADA CON EL DOLOR NEOPÁTICO?	20
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. HIPÓTESIS	24
5. OBJETIVOS	25
6. MÉTODOS	26
6.1. Extracción de RNA de cultivo celular (N1E-115)	26
6.2. PCR en Tiempo Real	27
6.3. Cultivo celular	30
6.4. Análisis estadístico	31
7. RESULTADOS	32
8. DISCUSIÓN	40
9. CONCLUSIONES	44
10.REFERENCIAS	45
11.ANEXOS	55

1. INTRODUCCIÓN

Desde su descubrimiento, hace más de 40 años, los miembros de la familia de las proteínas calpaína se han relacionado con una amplia gama de condiciones patológicas incluyendo diabetes mellitus tipo 2, muerte celular neuronal, Huntington, Alzheimer, cáncer, cataratas, distrofias, entre otras. Sin embargo, queda mucho por conocer acerca del mecanismo exacto de la calpaína y sus sustratos específicos los cuales juegan papeles esenciales en el desarrollo de estas enfermedades. Este trabajo presenta una estrategia para entender la regulación de la expresión de las diferentes isoformas de calpaína¹⁰ durante la elevación de la glucosa.

En la actualidad existen diversas investigaciones relacionados al estudio de las calpaínas asociadas a distintas enfermedades, en caso particular de la calpaína 10 es una proteasa involucrada con distintas patologías y se sabe muy poco de su comportamiento en estas. Se ha reportado que en diabetes mellitus aumenta en los islotes pancreáticos cuando se presenta una hiperglucemia, pero no está claro su papel en esta enfermedad, al igual se le ha asociado en distintas neuropatías.

La prevalencia de la diabetes está aumentando a nivel mundial y, como resultado, sus complicaciones asociadas también están aumentando. La Neuropatía diabética es una complicación bien conocida de la diabetes y la causa más común de todo el dolor neuropático. Alrededor de un tercio de todos los pacientes diabéticos sufren de Neuropatía diabética. Tiene un efecto enorme en la vida diaria de una persona, tanto física como mentalmente.

El origen del dolor neuropático no se entiende completamente. Las anomalías en el sistema nervioso periférico o central podrían estar relacionadas con la hiperglucemia, ya que esta es la anomalía metabólica clave de la diabetes (Aslam *et al.*, 2014). Hay muchas otras condiciones que producen dolor similar a la Neuropatía diabética y también pueden ayudar a nuestra comprensión de la fisiopatología de la Neuropatía diabética. Por lo que se propone avanzar en el estudio del papel que juega la calpaína en el desarrollo de enfermedades

neurodegenerativas, como lo es el dolor neuropático que se relaciona con diabetes mellitus.

2. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades

Las calpaínas (CAPN) son una familia de cisteín-proteasas no lisosomales, activadas por calcio intracelular. Según su patrón de expresión, pueden ser ubicuas o tejido específicas. Entre las ubicuas están la m-calpaína, μ -calpaína, CAPN4, CAPN5, mientras que en los tejidos específicos se cuentan la CAPN3 en el músculo, o la CAPN8 en el estómago y en retina, entre otras (Ver Tabla 1; Goll *et al.*, 2002, Bartoli y Richard, 2007 y Neumar, *et al.*, 1998). Las calpaínas están implicadas en varios procesos celulares regulados por calcio, incluyendo la modulación de la señal de transducción de proteínas, proliferación y diferenciación celular, apoptosis, activación de plaquetas y la fusión de membranas, (Goll *et al.*, 2002 y Carragher 2007). Aunque hasta hace poco las calpaínas eran consideradas enzimas citoplasmáticas; estudios recientes han demostrado que alguna de las isoformas se pueden encontrar en las mitocondrias (m-calpaína, μ -calpaína y la CAPN10), se les atribuye un papel importante en procesos de necrosis y apoptosis celular (Kar *et al.*, 2010). Una característica particular de las calpaínas es proteolisar parcialmente su sustrato, dando como resultado la activación o la inhibición de la función de este y, por éste motivo han sido postuladas como un componente integral de la señalización celular (Horikawa, *et al.*, 2000).

En 1964, Guroff descubrió una proteinasa neutra dependiente de Ca^{+2} en cerebro de rata, que posteriormente se identificó como calpaína (Sorimachi, *et al.*, 1997 y Huston, *et al.*, 1968). En 1984, clonaron el ADN complementario de la subunidad principal de la calpaína (Ohno, *et al.*, 1984 y Sorimachi, *et al.*, 1995) sobre la base de la secuencia del genoma humano (Dear, *et al.*, 2001), y al menos se identificaron 14 homólogos de la CAPN que forman una superfamilia (Sorimachi, *et al.*, 1997 y Huang and Wang, 2001).

2.2. Estructura y clasificación

Las calpaínas se clasifican de acuerdo a las unidades que las conforman, en típicas y atípicas:

2.2.1. Calpaínas típicas

Las calpaínas comprenden una unidad funcional principal y pueden asociarse a una subunidad auxiliar de bajo peso molecular. Por ejemplo, la CAPN2 es un heterodímero que comprende una subunidad catalítica de alrededor de 80 kDa (la proteína codificada por el gen *capn2*) y una subunidad pequeña de aproximadamente 28 kDa (la proteína codificada por *cpns1/capn4*); por el contrario, CAPN3 funciona ya sea como un monómero de una proteína de 94 kDa o un homodímero de esa proteína (Suzuki *et al.*, 2004).

Estas calpaínas incluyen un tipo de subunidad *penta-EF-hand* del dominio de unión a calcio con relación al dominio IV (dIV) de calpaínas 1 o 2 y dominio VI (dVI) codificada dentro de *cpns1* (Fig. 2). El grupo incluye CAPN1, la CAPN2, CAPN3 (también llamada p94), CAPNs 8, 9, 11, 12 y 14 (Tabla 1), y los tres tipos de CAPNs de *Drosophila* (A, B y C anteriormente CG3692). A este grupo también se le conoce como CAPNs “convencionales” (Hosfield *et al.*, 1999).

Las CAPN 1 y 2 (μ y m-calpaína) han sido las más estudiadas. Están compuestas por dos subunidades polipeptídicas, una subunidad principal de 80Kd que presenta entre 55-65% de homología entre las dos isoformas y una subunidad reguladora de 30kD que se asocia con cualquiera de las dos subunidades principales (Fig. 1). Sin embargo, estas dos calpaínas se diferencian en sus requerimientos de calcio (DeLuca *et al.*, 1993), de ahí el término μ y m, por micromolares y milimolares respectivamente (Nishimura *et al.*, 1991). La subunidad mayor de 80kD es la que posee actividad catalítica, y está formada por 4 dominios. El primero o dominio I es amino-terminal de anclaje tipo α hélice, el cual es importante en la regulación y en la disociación de la subunidad. El dominio II es el de la actividad catalítica, se divide en dos subdominios (IIa y IIb) que contienen residuos de Cys y de His/Asn respectivamente (figura 1). En ausencia de calcio estas subunidades se mantienen separadas formando una amplia brecha

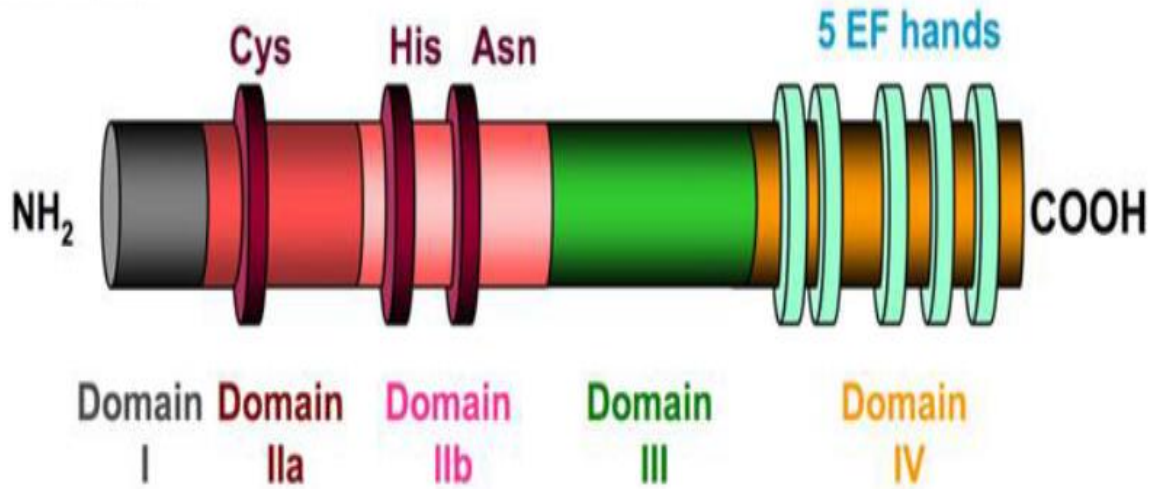
que interrumpe la tríada catalítica; para inactivar a la enzima, el dominio III se une al Ca^{+2} y a fosfolípidos y por lo que es llamado *calmodulin-like* por su similitud con la calmodulina, formando un mecanismo llamado "switch electrostático", el cual, se ha propuesto como un posible mecanismo de activación mediado por la unión a calcio (Strobl *et al.*, 1999). Este sitio está representado por el bucle de ácido en el dominio III que forma un puente de interdominio con cadenas laterales básicas en el subdominio IIa (Hosfield *et al.*, 1999 y Strobl *et al.*, 2000). El dominio IV es también llamado dominio *penta-EF-hand*, consiste en dos hélices peptídicas conectadas por un puente de Ca^{+2} , el cual es importante para la formación de dímeros. Esta subunidad de 80kD en las CAPNs 3, 8, 11, 12 y 13 no interactúa con la de 30kD, a pesar de que cuentan con el dominio IV (DeLuca *et al.*, 1993)

La subunidad reguladora 30kD en las CAPNs 1, 2 y 9 está formada por dos dominios, el dominio V amino terminal y el dominio VI *penta-EF-hand* (sitio de unión al calcio) muy similar al dominio IV de la subunidad 80kD (Figura 1; Goll *et al.*, 2002).

2.2.2. Calpaínas atípicas:

Este tipo de calpaínas carecen de un dominio *penta-EF-hand*, también llamadas calpaínas "no convencionales" (Figura 2). No existe una clasificación simplificada de estos genes o sus proteínas debido a la variedad de dominios o módulos alternativos que pueden presentar, e incluyen a CAPN5, 6, 7, 10, 13 y 15. CAPN5 de Humano y CAPN6 también incluyen un dominio C2 más clásico, anteriormente conocido como el módulo T (Croall y Ersfeld, 2007). La CAPN10 es especialmente interesante, porque el dominio calmodulina es reemplazado con un divergente dominio T que no contiene estructuras *penta EF-hand* de unión a calcio (Fig. 2; Sokol and Kuwabara, 2000).

80 kDa



30 kDa

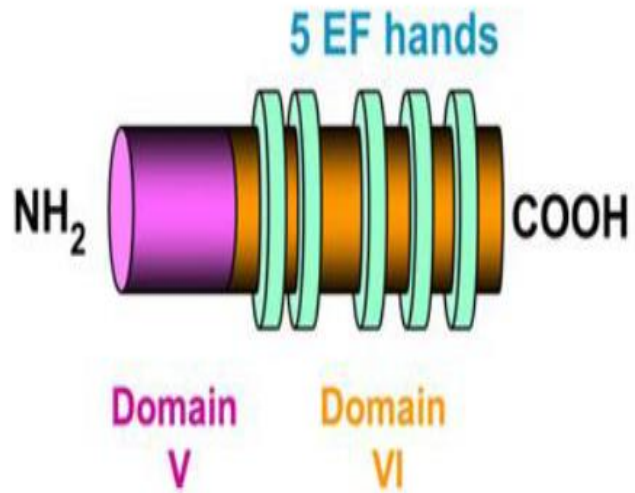


Fig. 1.- **Estructura típica de una calpaína.** Se muestran seis dominios encontrados entre las subunidades 80 y 30 kDa, los óvalos de color azul claro representan *EF-hand* (Tomado de Goll *et al.*, 2003).

Las calpaínas 5, 6 y 10 retienen el dominio III, pero es seguido por el dominio-T, un homólogo de las proteínas TRA-3 de *Caenorhabditis elegans* (Dear *et al.*, 1997). El gen de la calpaína 6 está situado en Xq23 en los seres humanos, siendo la única calpaína codificada en un cromosoma del sexo. Su patrón de expresión es principalmente restringida a la placenta, con bajos niveles de expresión en los tejidos adultos (Dear *et al.*, 1997). La proteína de la calpaína 6 carece del residuo de cisteína del núcleo catalítico (dominio II), que se sustituye por una lisina, por esta razón, se piensa que es una proteasa no funcional.

La CAPN 11 y 13, son detectadas principalmente en los testículos, aunque la calpaína 13 también ha sido detectada en el pulmón (Dear *et al.*, 1999 y 2001). Sus funciones y su eventual papel en enfermedades humanas no ha sido esclarecida.

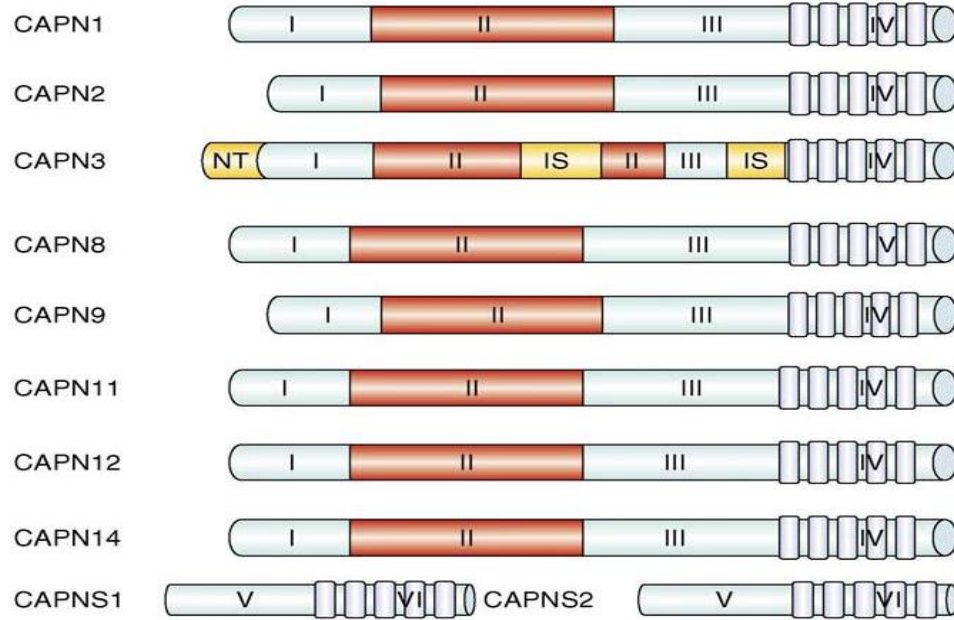
Las CAPNs 7 y 15 son las más divergentes de la familia y su homología con las CAPNs clásicas está restringida al dominio II. La CAPN7 se caracteriza por un dominio -NH₂ grande y un dominio -COOH terminal, que reemplaza a los dominios III y IV de las CAPNs clásicas, muy diferentes a los demás términos de la serie, y denominado Pal B-homólogo (PBH; Fig. 2). Su nombre alude a la semejanza con una proteasa caracterizada en el género *Aspergillus* y que se denomina *Aspergillus nidulans* Pal B proteasa (Franz *et al.*, 1999).

La CAPN15, a menudo denominada SOL H (*Small optic lobe homology*) por semejanza a la secuencia peptídica encontrada en una proteína codificada por el gen de *Drosophila melanogaster* “*small optic lobes*”, (Kamei *et al.*, 1998). Las CAPNs 5, 6 y 10 tienen el dominio T en el extremo COOH terminal (Fig. 2; Goll *et al.*, 2003). La CAPN 10 no presenta las uniones para Ca²⁺ típicas en el dominio II. El dominio III se caracteriza por la ausencia de las uniones para los fosfolípidos (Goll *et al.*, 2003 y Evans *et al.*, 2001)

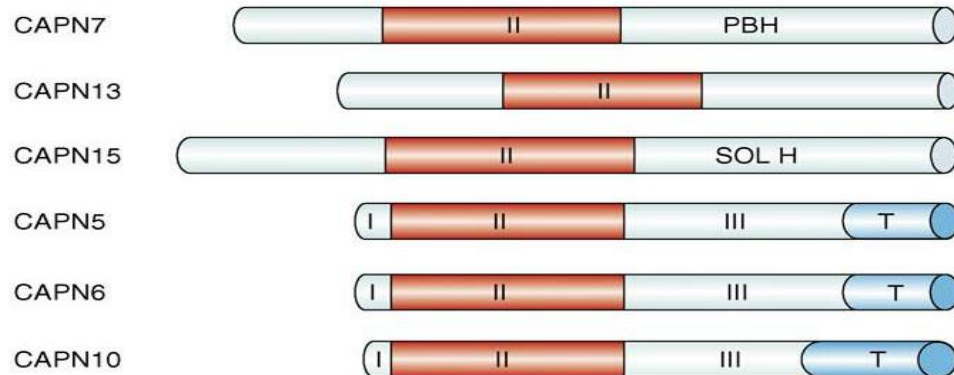
En los siguientes apartados describiremos a grandes rasgos la importancia de las calpaínas en el desarrollo de varias enfermedades. Sin embargo, por ser del interés de este estudio, haremos especial énfasis en la relación de la CAPN10 con la diabetes.

Calpaínas típicas

Gen que codifica



Calpaínas atípicas



Drug Discovery Today

Fig. 2.- Estructura de las distintas calpaínas con sus distintos dominios, así, como su clasificación (Tomada de Saez *et al.*, 2006)

2.3. FUNCIÓN Y RELACIÓN CON ENFERMEDADES

Las calpaínas, son proteasas, que tiene diversas funciones en células y organismos, entre otras en la división celular, la neoplasia, y la función cardíaca. En el sistema nervioso son cruciales para funciones neuronales tales como el aprendizaje, la memoria y los mecanismos de muerte neuronal (Wu, *et al.*, 2006).

Como ya se mencionó, las calpaínas se expresan de forma ubicua en organismos que van desde los microorganismos hasta los mamíferos (incluyendo a la especie humana). La Calpaína atrajo mucha atención debido a los descubrimientos que correlacionan las mutaciones de genes de calpaína con enfermedades humanas, junto con la elucidación de su estructura tridimensional (Hosfield *et al.*, 1999 y Strobl *et al.*, 2000) y los mecanismos de su activación inducida por calcio (Moldoveanu *et al.*, 2002 y Reverter *et al.*, 2001). La clonación posicional de genes responsables de enfermedades ha revelado la asociación del gen de calpaína 3 (CAPN3) con distrofia muscular de anillo óseo del tipo 2A (LGMD2A; Tabla 1; (Richard *et al.*, 1995) y el gen de CAPN10 (Capn10) con diabetes tipo 2 (Horikawa *et al.*, 2000).

El vínculo entre la CAPN3 y LGMD2A, ha sido analizado a nivel molecular (Ono *et al.*, 1998), pero la información molecular y fisiológica sobre mecanismos que explican la asociación del gen de calpaína 10 con la diabetes tipo 2 aún no está claro y es escaso (Baier *et al.*, 2000 y Permutt *et al.*, 2000). No solo estos dos tipos de calpaínas causan patologías, sino que otros miembros de la familia calpaína han sido implicados en varios fenómenos biológicos y patológicos, tales como la apoptosis, la fusión de mioblastos, metástasis tumoral, isquemia y lesión traumática del cerebro, enfermedad de Alzheimer, entre otros (Tabla 1; Croall *et al.*, 1991 y Bano *et al.*, 2005).

2.3.1. Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una de las condiciones con las que calpaína 1 y 2 se han asociado con mayor frecuencia, se cree que éstas participan en los eventos moleculares que conducen a la hiperfosforilación de tau, la proteína

principal que se encuentra en los ovillos neurofibrilares (NFTs) observados en los cerebros de los pacientes que sufren de EA (Higuchi *et al.*, 2005). Además, la acción proteolítica de calpaínas sobre tau y otras proteínas de neurofilamentos se relaciona con la muerte celular necrótica observado en EA (Park y Ferreira 2005). Una de estas proteínas del citoesqueleto escindidas por calpaínas es α -espectrina, muy abundante en las neuronas; la acción de las calpaínas sobre esta proteína genera productos de degradación únicas (BDP) que se utilizan como marcadores de actividad de calpaína *in vivo*. Los niveles elevados de espectrina BDPs han sido observados en la lesión hipóxica e isquémica del cerebro, corazón y riñón, lo que permite la identificación de la activación de la calpaína como uno de los primeros eventos causales en la degeneración de estos tipos celulares (Vanderklish *et al.*, 2000).

Otra calpaína asociada al Alzheimer ha sido la calpaína 12, que normalmente es altamente expresada en los folículos pilosos de ratón y en menores niveles en casi todos los tejidos humanos (Dear *et al.*, 2000). La proteína existe en tres isoformas, dos de los cuales, carecen de la calmodulina como dominio (dominio IV). La calpaína 12 contenida dentro de placas de amiloide en el modelo de ratón Tg2576 de la enfermedad de Alzheimer se modifican por nitración, pero el impacto de modificación en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer no ha sido explorada (Shin *et al.*, 2004).

2.3.2. Huntington

Otro trastorno neurológico relacionado con la actividad de la calpaína es la enfermedad de Huntington (EH), se ha observado que proteosomas y caspasas escinden la proteína HTT en múltiples sitios, lo que genera fragmentos de proteínas tóxicas que finalmente conducen a la pérdida neuronal (Gafni y Ellerby 2002). La calpaína 7 se caracteriza por la presencia de un gran dominio N-terminal y un PalB- homóloga (PBH) dominio C-terminal (Franz *et al.*, 1999). Los niveles de esta proteína ubicua, junto con otros miembros de la familia de calpaínas, como CAPN 1, CAPN 5 y CAPN 10, están en altas concentraciones en modelos de

ratones transgénicos con enfermedad de Huntington, lo que sugiere que podrían contribuir a esta patología neurológica (Gafni *et al.*, 2004).

2.3.3. Parkinson

En la enfermedad de Parkinson (EP), α -sinucleína es el mayor componente de inclusiones fibrilares neuronales llamadas cuerpos de Lewy (LBs), es también un sustrato para calpaínas pero aún no se sabe su mecanismo en esta enfermedad (Mishizen-Eberz *et al.*, 2005). El papel de la actividad de la calpaína en las enfermedades desmielinizantes es por la escisión de la mielina, así como otras proteínas del citoesqueleto, que también son importantes en mecanismos patológicos en lesiones traumáticas del cerebro y la médula espinal (Ray *et al.*, 2003).

2.3.4. Distrofias

Un aumento de la actividad de la calpaína también se ha detectado en distrofia de Duchenne y Becker, dos trastornos neuromusculares de desgaste muscular relacionados a la ausencia de distrofina, lo que lleva a un aumento de los niveles de Ca^{+2} en el músculo. Este aumento conduce a la sobreactivación de calpaína, la cual, contribuye a la pérdida de masa muscular por la ruptura miofibrilar o de las proteínas del citoesqueleto, como la titina, nebulina, troponinas y tropomiosina, pero tienen poco o ningún efecto sobre la miosina y la actina, las dos principales proteínas contráctiles en el músculo esquelético (Goll *et al.*, 2003).

2.3.5. Cataratas

La acción proteolítica de la calpaína 2 en proteínas del lente causa cataratas en los seres humanos. Aunque también otras calpaínas, tales como calpaína 10, se han detectado en el cristalino del ojo humano, el aumento en la opacidad de esta estructura ocular es causado principalmente por la regulación positiva de m-calpaína (Biswas *et al.*, 2005). Los trastornos mencionados anteriormente están mediados por el aumento en los niveles de calcio intracelular, a menudo relacionados con la excitotoxicidad del glutamato, lo que conduce un aumento de la actividad de la calpaína (Lynch y Baudry 1984). La calpaína 15 se expresa en

niveles bajos en la mayoría de los tejidos, excepto en el pulmón y los testículos, donde tiene su tasa más alta de expresión. Aunque la región genómica que contiene el gen de la calpaína 15 ha sido implicada en una translocación cromosómica en una familia afectada por catarata hereditaria con microftalmia (CATM; Yokoyama *et al.*, 1992).

2.3.6. Cáncer

La actividad de la calpaína alterada también ha sido observada en varios tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama, de ovario, próstata, la piel, el cerebro o los carcinomas colorrectales, donde calpaína 1 y calpaína 2 han demostrado ser reguladores positivos. las calpaínas pueden proteolíticamente degradar varios sustratos implicados en la adhesión celular, tales como quinasa de adhesión focal (FAK), β -catenina y la integrina, proteínas en adición al producto de diferentes oncogenes (c-Fos, c-Jun, v-Src, v-Jun, v-Myc, k-Ras y v-Fos) y genes supresores de tumores (p53) (Goll *et al.*, 2003).

El gen de la calpaína 9, con un patrón de expresión restringido al tracto digestivo (Lee *et al.*, 1998), se regula negativamente en el cáncer gástrico (Yoshikawa *et al.*, 2000). La misma situación se ha reportado que se produce en células diana del corazón y el riñon (Markmann *et al.*, 2005). La proteína CAPN 9 es quizá la calpaína atípica más similar a las calpaínas clásicas en términos de sus propiedades enzimáticas y en la forma de activación, ya que parece interactuar con una subunidad 30kb para lograr su conformación funcional (Lee *et al.*, 1999).

La CAPN 6 se ha observado que puede ser un regulador positivo durante la diferenciación temprana de mioblastos en cultivo (Zhao *et al.*, 2002). Esta calpaína también se sobreexpresa en leiomiomas de útero, el tumor más frecuente del sistema genitourinario de las mujeres (Skubitz *et al.*, 2003).

2.3.7. Otras enfermedades

Como se ha mencionado anteriormente, la CAPN 5 humana es un ortólogo del nematodo *C. elegans*, TRA - 3 (Dear *et al.*, 1997). TRA- 3 está involucrada en la determinación del sexo del gusano a través de la escisión proteolítica del extremo

citoplásmico de la transmembrana del receptor TRA-2, que se va al núcleo donde se aumenta la actividad feminizante del factor de transcripción de TRA-1 (Kuwabara y Perry, 2005). En los seres humanos esta calpaína se distribuye de forma ubicua con los niveles más altos en el cerebro, los pulmones, el hígado y los testículos (Waghray *et al.*, 2004). Su amplio patrón de expresión sugiere que tiene una función más general en los seres humanos que en su ortólogo presente en nematodos (*C. elegans*). De esta manera, las variantes de genes de CAPN 5 se han asociado con síndrome de ovario poliquístico y varias características del síndrome metabólico, incluyendo la obesidad, la hipertensión y dislipidemia (González *et al.*, 2006).

2.4. CALPAÍNA 10 Y DIABETES

El gen *CAPN10*, está formado por 15 exones, distribuidos a lo largo de 16 kilobases (kb) y produce una proteína de 672 aminoácidos. Se conoce que por splicing alternativo genera al menos ocho transcripciones de CAPN10 (calpaína-10a - 10h; Horikawa *et al.*, 2000) y es un mecanismo de regulación de la expresión génica y la abundancia de mRNA de isoformas específicas y proteínas (Fig. 3; Inoue *et al.*, 1995). La CAPN10a se expresa en gran cantidad en el corazón, y en aquellos tejidos que cumplen un papel importante en el metabolismo de la glucosa como el hígado, músculo, islotes pancreáticos y adipocitos. La CAPN10c y g se han detectado en muchos tejidos, en tanto que las CAPN10b, d, e y f son raras (Horikawa *et al.* 2000 y Suzuki *et al.*, 2004). Esta calpaína se expresa de forma ubicua en tejidos humanos (Ma *et al.*, 2001). El nivel del mensajero en el ratón varía, dependiendo del tejido, pero es muy elevado en el corazón seguido por el cerebro, hígado, riñón y páncreas (Horikawa *et al.*, 2000 y Braun *et al.*, 1999).

La calpaína 10 es especialmente interesante, porque el dominio calmodulina fue reemplazado con un divergente dominio T que no contiene estructuras EF-hand de unión a calcio (Sokol *et al.*, 2000) y para la dimerización con la subunidad 28 kDa (Goll *et al.*, 2003). Esto sugiere la posibilidad que la mayoría tejidos contienen una calpaína que no necesita calcio para su actividad o utiliza un mecanismo de activación diferente al de las calpaínas tradicionales. (Ma *et al.*, 2001)

Calpaína	Nombre del gen	Otro nombre	Distribución	Enfermedades	Clasificación
Calp1	<i>Capn1</i>	μ -Calpaína, CAPN1	Ubicua	Enfermedad de Huntington, cataratas, distrofia muscular, daños cerebrales, daños en la médula espinal, Alzheimer, cáncer, esclerosis múltiple, enfermedad de Lou Gehrig, osteopenia, isquemia.	Típica
Calp2	<i>Capn2</i>	m-Calpaína, CAPN2	Ubicua	Cataratas, distrofia muscular, isquemia, daños cerebrales, daños en la médula espinal, Alzheimer, Parkinson, arterioesclerosis, esclerosis múltiple, enfermedad de Lou Gehrig, cáncer, psoriasis.	Típica
Calp3	<i>Capn3</i>	nCL-1, p94, Lp82, Lp85, Rt88	Músculo esquelético, lente y retina	Distrofia muscular Limb-girdle de tipo 2A, cataratas	Atípica
Calp4	<i>Capn4</i>		Ubicua		Atípica
Calp5	<i>Capn5</i>	htra3, nCL-3	Ubicua (alta en el colon, el intestino delgado y los testículos)	Enfermedad de Huntington, ovarios poliquísticos, síndrome metabólico	Atípica
Calp6	<i>Capn6</i>	CAPNX, Calpamodulina	Placenta		Atípica
Calp7	<i>Capn7</i>	palBH	Ubicua	Enfermedad de Huntington	Atípica
Calp8	<i>Capn8, ncl-2</i>	nCL-2	Mucosa del estómago		Típica
Calp9	<i>Capn9</i>	nCL-4	Tracto digestivo	Cáncer de estómago	Típica
Calp10	<i>Capn10</i>	CAPN10, CAPN8	Ubicua	Enfermedad de Huntington, diabetes mellitus, aterosclerosis, síndrome metabólico, ovario poliquístico.	Atípica
Calp11	<i>Capn11</i>		Testículo		Típica
Calp12	<i>Capn12</i>		Ubicua (alta en folículo de pelo)		Típica
Calp13	<i>Capn13</i>	Sol H	Testículo y pulmón		Atípica
Calp14	<i>Capn14</i>		Ubicua		Típica
Calp15	<i>Capn15</i>		Ubicua (alta en pulmón y testículo)	Catarata hereditaria con microftalmía (CATM)	Atípica

Tabla 1.- Características, localización y enfermedades que causan la familia de las calpaínas. (Basado en Huang y Wang 2001, Storr *et al.*, 2001 y Kar *et al.*, 2010)

De las ocho variaciones de *splicing* de calpaína 10, tres de ellas carecen por completo del dominio II y por tanto de la actividad como proteasa (Horikawa *et al.* 2000). Se ha mostrado en diversos estudios que existe CAPN10 en mitocondria y se encuentra involucrada en la disfunción mitocondrial inducida por calcio por su escisión de subunidades de complejo I de la cadena de transporte de electrones (Arrington *et al.*, 2006).

Ciertas variantes alélicas en el gen de la calpaína 10 se han asociado con un mayor riesgo de diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Esto fue descrito por primera vez por Horikawa *et al.*, en 2000, analizando el genoma de una población México-americana, mediante la técnica de clonación posicional. En este estudio, se encontró que la combinación del haplotipo 112-121 (que comprende los locus de polimorfismos UCSNP -43, -19 y -63 de la calpaína 10) tiene alta prevalencia en pacientes diabéticos, por lo que su presencia se asocia con el riesgo de contraer diabetes en humanos. Desde entonces, la función de la calpaína 10 se ha examinado en diferentes grupos étnicos con resultados variables. Sin embargo, el metaanálisis de varios de estos estudios realizado por Weedon y col. (Weedon *et al.*, 2003) confirman la asociación de CAPN10 con DM2.

Varios rasgos continuos relacionados con DM2 y enfermedades cardiovasculares han sido investigados en el locus de la CAPN 10. Por ejemplo, La expresión alterada de CAPN 10 en páncreas, músculo, y las células de grasa se postuló para liderar a la homeostasis de la glucosa debido a la modificación desconocida de CAPN10 (Horikawa *et al.*, 2000). También hay una asociación de variantes de CAPN10 con niveles de insulina mayores a lo normal. La calpaína 10 efectúa un papel de regulador en células β pancreáticas en la secreción de insulina y en los mecanismos de apoptosis en estas células, que incluye el receptor de rianodina tipo 2 (RyR2) (Marshall *et al.*, 2005, Johnson *et al.*, 2004).

Los niveles de colesterol se han asociado también al gen de la CAPN10 en una muestra combinada de los pacientes con DM2 y de las mujeres afectadas por síndrome de ovario poliquístico (PCOS), un trastorno endocrino común en mujeres en edad reproductiva, que se caracteriza por hiperandrogenemia, anovulación

crónica y una mayor prevalencia de trastornos cardiovasculares (Daimon *et al.*, 2002 y González *et al.*, 2002). Recientemente, una asociación de la calpaína 10 con síndrome metabólico se ha descrito en una población de Corea (Kang *et al.*, 2006). La CAPN10 expresa su actividad en tejidos importantes como control de la homeostasis de la glucosa, lo cual sugiere que, pudiera afectar la secreción y acción de la insulina y la producción de glucosa hepática (Goll *et al.*, 2003 y Lynn *et al.*, 2002)

En el citoesqueleto la calpaína 10 desempeña un papel crítico tanto en el tráfico intracelular de proteínas estimulado por la glucosa y la exocitosis de los gránulos secretores que contienen insulina. Las calpaínas a menudo funcionan para escindir la proteína del citoesqueleto, proporcionando de ese modo un posible papel adicional para la implicación de la calpaína en el tráfico de vesículas, y por lo tanto la homeostasis de la glucosa. No obstante, estudios previos han demostrado que no se requiere la calpaína-10 para el tráfico de vesículas, GLUT4 responde a la insulina y la absorción de glucosa en adipocitos 3T3-L1 (Paul *et al.*, 2003). Específicamente, tanto la inhibición de calpaína farmacológica y la sobreexpresión de un vector antisentido de calpaína-10 bloquearon la reorganización de la actina que se requiere para que la insulina estimule la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática en los adipocitos. También se ha demostrado que la inhibición de la actividad de la calpaína también se ha demostrado que es perjudicial para la captación de glucosa en el músculo esquelético (Logie *et al.*, 2005).

Curiosamente, en β -células se ha demostrado que sólo la isoforma de 54 kDa de la CAPN10 se asocia con el citoesqueleto (Turner *et al.*, 2007). Como esta es la misma isoforma que se muestra a asociar con y escindir el t-SNARE SNAP-25 (Marshall *et al.*, 2005), por lo tanto, se especula que la calpaína-10 podría regular la secreción de insulina como parte de un único complejo en la membrana plasmática. El apoyo a esta hipótesis proviene de la constatación de que existe una interacción dinámica entre complejos SNAREs y F-actina en la secreción de insulina estimulada por la glucosa (Thurmond *et al.*, 2003).

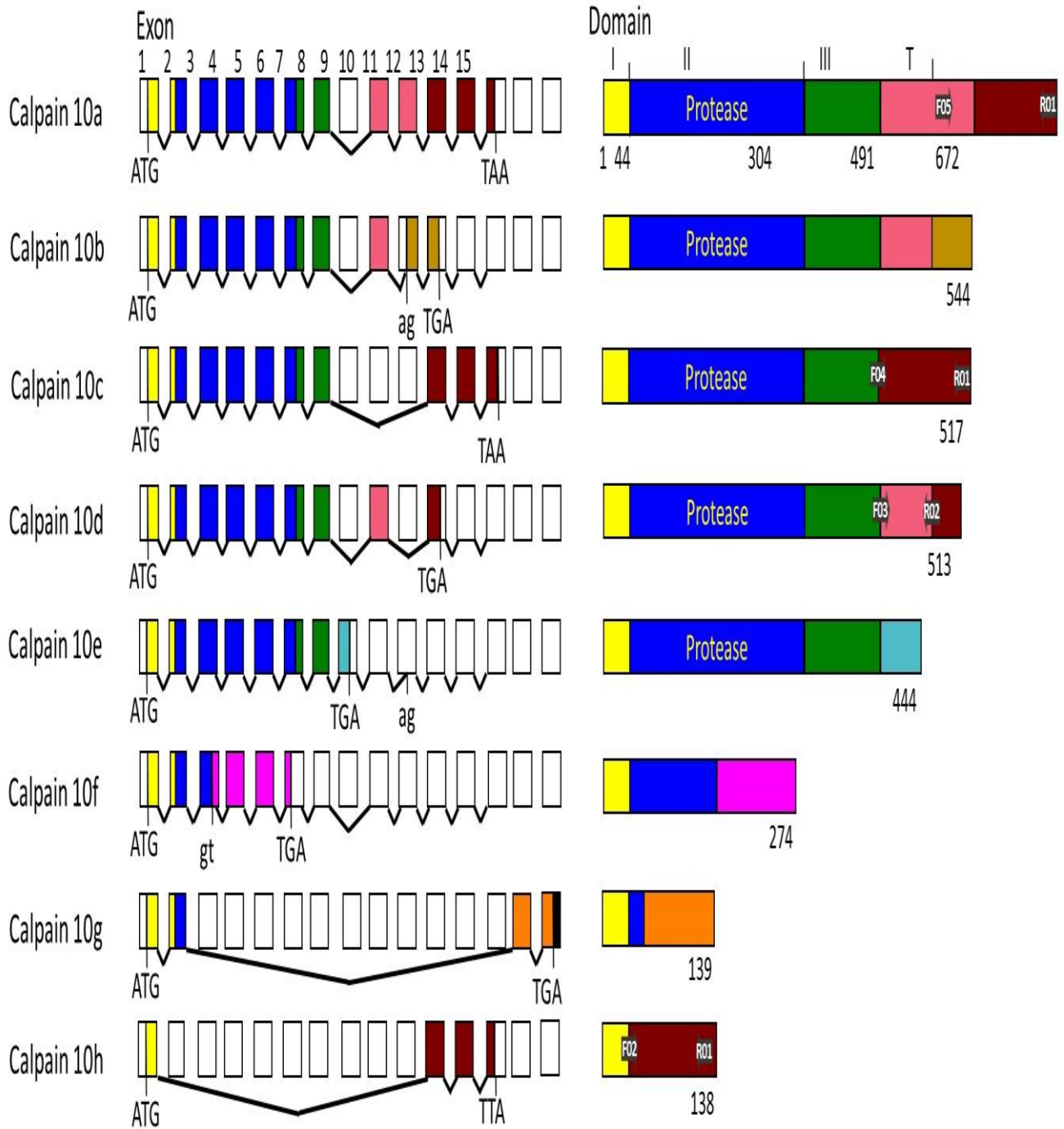


Fig. 3. *Splicing* alternativo del mRNA de CAPN10. Se muestran los patrones de *splicing* alternativo y la organización de las proteínas de calpaína-10 generadas por *splicing* alternativo. Se indican los cuatro dominios que definen a calpaínas. Los números indican el residuo de aminoácidos en los límites entre dominios (Tomado de Horikawa *et al.*, 2000).

Para entender cómo las mutaciones del gene de CAPN10 afectan la susceptibilidad de adquirir diabetes, se debe conocer el mecanismo de activación de calpaína en el nivel molecular y su función fisiológica ya que son esenciales. Aunque varios estudios recientes han probado la relación entre la CAPN 10 y diabetes (Bodhini *et al* 2011, Ezzidi *et al.*, 2010 y Zhou *et al.*, 2010), hay muchos aspectos que todavía no se han aclarado. Por esta razón es de mucha relevancia el desarrollo de nuevas investigaciones sobre este tipo de calpaína y sus posibles inhibidores, en los distintos tejidos que se expresa pero principalmente en los de mayor relevancia médica.

2.5. ¿PODRÍA ESTAR LA CAPN10 RELACIONADA CON EL DOLOR NEUROPÁTICO?

Uno de los antecedentes más importantes con respecto a la calpaína y su relación con el dolor proviene de von Reyn *et al.*, (2009). En este estudio los investigadores encontraron que la calpaína 1 está posiblemente involucrada en padecimientos neurológicos tales como isquemia, lesión de la médula espinal y lesión cerebral traumática, posteriormente en 2012 estos mismos investigadores utilizaron un modelo *in vitro* de lesión cerebral traumática para investigar la relocalización subcelular de la activación de la calpaína y confirman la participación de la calpaína en la proteólisis mediada por α -subunidades de canales de sodio dependientes de voltaje. Dado que la CAPN10 se encuentra sobre expresada en Diabetes Mellitus tipo II queremos saber si juega un papel en el desarrollo de dolor neuropático.

Se sabe además que la sobreactivación de calpaína está implicada en la neurodegeneración que resulta de una amplia gama de trastornos neurológicos y enfermedades neurodegenerativas como el accidente cerebrovascular, cerebral traumática y lesión de la médula espinal, y la enfermedad de Alzheimer (Saatman *et al*, 2010;. Vosler *et al*, 2008). Por ejemplo, Gafni y Ellerby en 2002 demostraron que la forma activa de la calpaína se incrementa sustancialmente en el caudado de los pacientes con enfermedad de Huntington, lo que sugiere, que los

fragmentos de la proteína huntingtina derivados de las escisiones que produce calpaína pueden contribuir a la etiología de la enfermedad de Huntington.

Con respecto a la relación de calpaína y la hiperglucemia, hay varias evidencias que apuntan a la regulación de la calpaína en la diabetes. Como ya se mencionó anteriormente en el apartado 2.4., Horikawa *et al.*, descubrieron un polimorfismo de nucleótido único (single nucleotide polymorphism; SNP, por sus siglas en inglés) en la calpaína 10, lo cual, en humanos con este SNP son más susceptibles a padecer diabetes tipo II (Horikawa *et al.*, 2000). Desde la publicación de esta investigación han sido muchos los estudios epidemiológicos que tratan de determinar qué grupos étnicos se ven afectados por este SNP en CAPN10 y la importancia relativa de la diabetes (Demirci *et al.*, 2008 y Bodhini *et al.*, 2011). Sin embargo, ha habido pocos estudios que aborden las funciones fisiológicas y patológicas de la CAPN10 en la diabetes.

Para la diabetes se ha estudiado la CAPN10 en los islotes pancreáticos, por ejemplo, Ling *et al.*, en 2009 observaron que el nivel de mRNA de CAPN10 aumentó en los islotes pancreáticos de pacientes con diabetes tipo 2 en comparación con los pacientes que no padecían esta enfermedad, estos datos sugieren una contribución de expresión de CAPN10 en la función secretora de insulina en los islotes pancreáticos aislados humanos.

Sin embargo la hiperglucemia afecta de maneras distintas a la calpaína 10 dependiendo del tejido a estudiar. Por ejemplo, sabemos que en el 2012 Covington y Schnellmann informaron de que la expresión de CAPN10 mitocondrial en cultivos primarios de células tubulares proximales renales (POCT) incubadas en medios de glucosa (17 mM) había disminuido, después de 72 horas, mientras que la calpaína 10 citosólica no disminuyó hasta cinco días después de incubadas en glucosa (Covington y Schnellmann, 2012). La reducción de la proteína de calpaína 10 fue el resultado de la disminución de la transcripción del mRNA de ésta. Además, sustratos acumulados mitocondriales de calpaína 10, disminuyo la respiración mitocondrial y aumento la apoptosis. El uso de un modelo *in vivo* de rata tratada con estreptozotocina (STZ) induce nefropatía renal diabética por

CAPN10, apoptosis y disfunción renal se produjo 10 semanas después de la aplicación (Covington y Schnellmann, 2012).

Con base a estos antecedentes y a lo mencionado en la introducción, nos preguntamos qué es lo que pasa en células neuronales cuando son expuestas a condiciones que emulan la hiperglucemia.

3. JUSTIFICACIÓN

La diabetes mellitus (DMT2) es un trastorno metabólico multifactorial caracterizada por la hiperglucemia. En la última década, DMT2 se ha convertido en uno de los problemas principales de salud en el mundo, se calcula que hay 347 millones de personas con diabetes y en 2010 fallecieron alrededor de 3,4 millones de personas como consecuencias del exceso de azúcar en la sangre. Según proyecciones de la OMS, la diabetes será la séptima causa de mortalidad en 2030.

El riesgo de padecerla es mayor en quienes consumen una alimentación hipercalórica, tienen vida sedentaria y antecedentes familiares con DMT2.

El dolor neuropático es una complicación que afecta a más de la mitad de la población diabética. Sin embargo los mecanismos que ligan la hiperglucemia con el dolor se desconocen. Una posibilidad involucra a la familia de las calpaínas, las cuales se han vinculado a la neurodegeneración isquémica, donde se ha visto que la calpaina1 proteolisa canales de sodio dependientes de voltaje. Lo que se pueda aprender con respecto a este fenómeno puede abrir la posibilidad de nuevos blancos terapéuticos para controlar o evitar el dolor neuropático, así como identificar y crear mejores estrategias terapéuticas.

4. HIPÓTESIS

Con base en lo mencionado antecedentes sabemos que la hiperglucemia afecta la expresión de calpaína 10 de maneras distintas dependiendo del tejido a estudiar por lo tanto, en este proyecto nos preguntamos primero si la hiperglucemia regula a la calpaína10 en células neuronales.

Nuestra hipótesis es que si se exponen a células de neuroblastoma (N1E-115) en condiciones que emulan la hiperglucemia se regulará calpaína10.

Sin embargo antes de abordar esta hipótesis se tuvo que investigar primero el perfil de expresión de las isoformas de calpaína en células N1E-115 ya que este dato no se sabía.

5. OBJETIVOS

Objetivo general

- Investigar el perfil de expresión de las isoformas Calpaína 10 y la posible regulación en respuesta a la elevación de la concentración de glucosa en células neuronales.

Objetivos particulares

- Determinar si se expresan los mRNAs (por sus siglas en inglés) de las isoformas a, c, d y h de Calpaína 10 mediante PCR en punto final.
- Investigar si el nivel de los mRNA cambia en respuesta a la elevación de la concentración de la glucosa durante 48 hrs. Mediante la técnica de PCR en tiempo real en células N1E-115.

6. MÉTODOS

6.1. EXTRACCIÓN DE RNA DE CULTIVO CELULAR (N1E-115)

Las extracciones de RNA se basaron en el procedimiento publicado por Ribaudo (2001; Anexo 2). Las células N1E-115 se desprendieron de la caja de cultivo mediante agitación después de haberlas expuesto con PBS-EDTA, estas células se homogeneizaron con TRIzol, se mezcló el homogeneizado con cloroformo (nivel molecular) y se centrifugaron a 12,000 g. Se recuperó la fase acuosa la cual se incubó a temperatura ambiente por 10 min con un volumen igual de isopropanol se dejó toda la noche, lo que propicia la precipitación del RNA.

El RNA se colectó mediante centrifugación a 12,000 g y se lavó con etanol al 75% antes de resuspenderlo en agua tratada con dietil-pirocarbonato (DEPC). La calidad del RNA se verificó en un gel de agarosa al 1.2% (figura 4) en 40 mM de Tris base, 5 mM de ácido acético y 10 mM de EDTA (*buffer* TAE). Las muestras de RNA se almacenaron a -70°C para su análisis posterior.

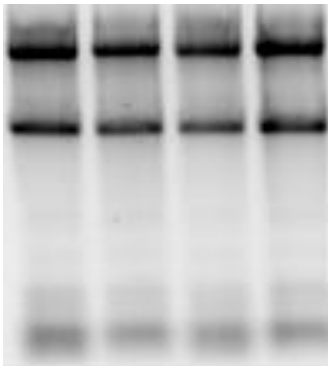


Figura. 4. **Integridad de mRNA de células N1E-115.** Se muestra un experimento típico de extracción de RNA y se observa la integridad.

Adicionalmente, se aisló el RNA total de cerebro, corazón, hígado y musculo esquelético de ratones macho de 3-4 semanas de edad, proporcionados por el Bioterio de la FES Iztacala. El RNA de estos tejidos sirvió como control positivo durante la identificación de las isoformas de CAPN10 en las células N1E-115. Para la obtención de estos tejidos los animales se sacrificaron por dislocación cervical. Se abrió el cráneo y la caja torácica y se removieron los tejidos, para el musculo esquelético se procedió a la disección de varios músculos de las

extremidades posteriores. Estos tejidos se lavaron con PBS 1X y se pesaron 100 mg de tejido los cuales se homogeneizaron en 1 ml de TRIzol con un homogeneizador de teflón. Los pasos subsecuentes son los mismos descritos para el cultivo celular.

6.2. PCR en Tiempo Real

La identificación de las isoformas de la calpaína 10 se realizó por medio de PCR en punto final y PCR en Tiempo Real (PCR-TR). Para estas reacciones se utilizaron seis pares de oligonucleótidos específicos para cada isoforma (Tabla 1). Estos oligonucleótidos están diseñados para que el Reverse (por sus siglas en inglés) reconozca los exones que componen el dominio T y el Forward que reconozca a parte del primer exón del dominio T y parte del último exón contiguo a este dominio.

Los oligonucleótidos fueron analizados con el programa FastPCR online para calcular sus temperaturas de alineamiento y determinar posibles interacciones entre los miembros de un mismo par y para verificar los productos que se generarían.

Para la PCR-TR se llevaron a cabo con los reactivos del kit comercial SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific). Las secuencias de los oligonucleótidos con sus combinaciones, las condiciones de reacción y los programas de amplificación utilizados se describen en las tablas 1, 2 y 3, respectivamente.

Tabla 1. Secuencia de los Oligonucleótidos y sus combinaciones

Oligonucleótidos		
Nombre	Secuencia 5' a 3'	
Calp10-R01	CCACAGAAAGGAGGCAGAG	
Calp10-R02	CTGCTGGAACCTGAGGGA	
Calp10-F02	ACCCCAGGTTCCAGCAGA	
Calp10-F03	CTGGAAGGTAGAGAAACGG	
Calp10-F04	CATCTGGAAGGTTCCAGCAG	
Calp10-F05	GAGACTGTGCAGTTGCAGG	
R18s-For	GGGAGCCTGAGAAACGGC	
R18s-Rev	GGGTCGGGAGTGGGTAATTT	
Combinaciones		
Nombre	Isoforma de calpaína 10	Producto (pb)
Calp10 R01/F05	Calp10a	319
Calp10 R01/F04	Calp10c	128
Calp10 R02/F03	Calp10d	220
Calp10 R01/F02	Calp10h	124
R18s Rev-For	Segmento 18s	68
GADPH Rev-For		463

Tabla 2. Componentes para la PCR-TR

Componentes	Concentración final
Agua	3.6 μ l
SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific)	1X
Molde (cDNA)	1 μ g
Oligonucleótido	0.6 μ M ^{c/u}
Volumen final	12 μ l

El programa de PCR-TR (Rotor-Gene 6) se introduce al servidor, el cual se encuentra acoplado al termociclador (*Rotor Gene RG3000 CORBETT RESEARCH*®) y consta de cuatro fases: desnaturalización, amplificación la cual consta de tres pasos (desnaturalización, hibridación y extensión), disociación y enfriamiento el programa utilizado para las isoformas de Calp10 se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Programa de PCR-RT utilizado para las isoformas de calp10

Programa	Número de ciclos	Segmento	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización	1	1	95	5 min
Amplificación	40	1 (desnaturalización)	95	15 seg
		2 (Hibridación)	60	15 seg
		3 (Extensión)	72	20 seg
Curva de Disociación	1	1	95	60 seg
		2	48	
		3	80	
Enfriamiento	1	1	40	30 seg

Al finalizar las reacciones, los productos de PCR (10 µl de cada tubo) se separaron en geles de agarosa al 1.2% con *buffer* TAE con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. Los geles se expusieron a luz ultravioleta usando el sistema de procesamiento y de análisis Image Lab 3.0 de BIO-RAD.

Para constatar que los productos de PCR fueran efectivamente las amplificaciones de cDNA y no de contaminación con DNA genómico, se incluyeron controles negativos sin Polimerasa reversa transcriptasa. Como controles positivos se utilizaron las muestras de RNA total de los distintos tejidos.

6.3. CULTIVO CELULAR

La línea celular N1E-115 son células de neuroblastoma las cuales provienen de cerebro de ratón, fueron mantenidas en una incubadora (*Revco Elite RCO3000T-5-ABC Forced-Air CO2 Incubator*) a 37°C con 5% de CO₂ y 95% de aire. Se

mantienen en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; gibco® No. De cat. 31600-026) baja glucosa (5mM, grupo control) adicionado con 10% de FBS (gibco®), 2mM de L-Glutamina (gibco®) y 1X de Pen/Strep (gibco®; Cuadro 4). Para el cultivo madre se realizó una tripzización cada 7 días resemebrando 400,000 células en contenedor plano de poliestireno de 75 cm³ de superficie. En la fase experimental se sembraron 360,000 células en cajas Petri (128 x 86 mm *Nalge Nunc NunclonDELTA MultiDishes, Sterile 150628/ 62407-332*), en medios completos DMEM de alta (25mM) (No. De cat.12100-038 gibco®) y baja glucosa. Para el mantenimiento de la línea celular se efectúan varios procedimientos que se detallan en anexo 1.

6.4. ANALISIS ESTADISTICO

Para el análisis estadístico las diferencias y las significancias estadísticas entre las expresiones de las isoformas de CAPN10 y los controles se determinó con la prueba de *t* de Student. Las gráficas aquí mostradas se representan con la media \pm el error estándar de la media, de los resultados obtenidos del método de $2^{-\Delta C_T}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

7. RESULTADOS

Como se menciona en las generalidades, solo cuatro de las ocho isoformas de la calpaína 10 contienen el dominio T que es el que se presume que interactúa con otras proteínas, por eso en este trabajo solo nos enfocamos en estas cuatro isoformas.

Para la detección de las isoformas de la calpaína 10, se aislaron mRNA de, cerebro de ratón así como de células de neuroblastoma de cerebro de ratón de la línea celular N1E-115, en todos los casos se hicieron de tres o cuatro extracciones independientes; Para las reacciones de RT se tomaron lo equivalente a 5µg de RNA total y para la PCR se tomó 1/20 de la reacción de la RT para cada uno de los juegos de oligonucleótidos de las cuatro isoformas a estudiar de CAPN10. Se utilizaron cuatro pares de oligonucleótidos los cuales fueron diseñados específicos para cada isoforma, para la elaboración de estos oligonucleótidos se tomó la secuencia del mRNA de calpaína 10 en ratón y se realizaron en base en esta. En el cuadro 1 se muestran los oligonucleótidos usados y como se combinaron para lograr la amplificación específica de cada isoforma. En la figura 3 se muestran los sitios de unión de los diferentes *primers* a las diferentes isoformas estudiadas. Como control positivo se realizó la amplificación del gen constitutivo para la enzima gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GADPH) para PCR en punto final y R18s para PCR en tiempo real.

En la figura 5, se puede observar que los datos son consistentes con las expectativas mostradas en la tabla 1.

De acuerdo con el cuadro 1 se observó el tamaño esperado de las isoformas en los distintos tejidos. CAPN 10 a, c y h se tanto en Células N1E-115 como en cerebro. El experimento mostrado en la figura 5 fue realizado con 35 ciclos de amplificación, sin embargo, nos da indicios de que el mRNA de CAPN 10a es la que se encuentra en mayor abundancia con respecto a las otras tres isoformas.

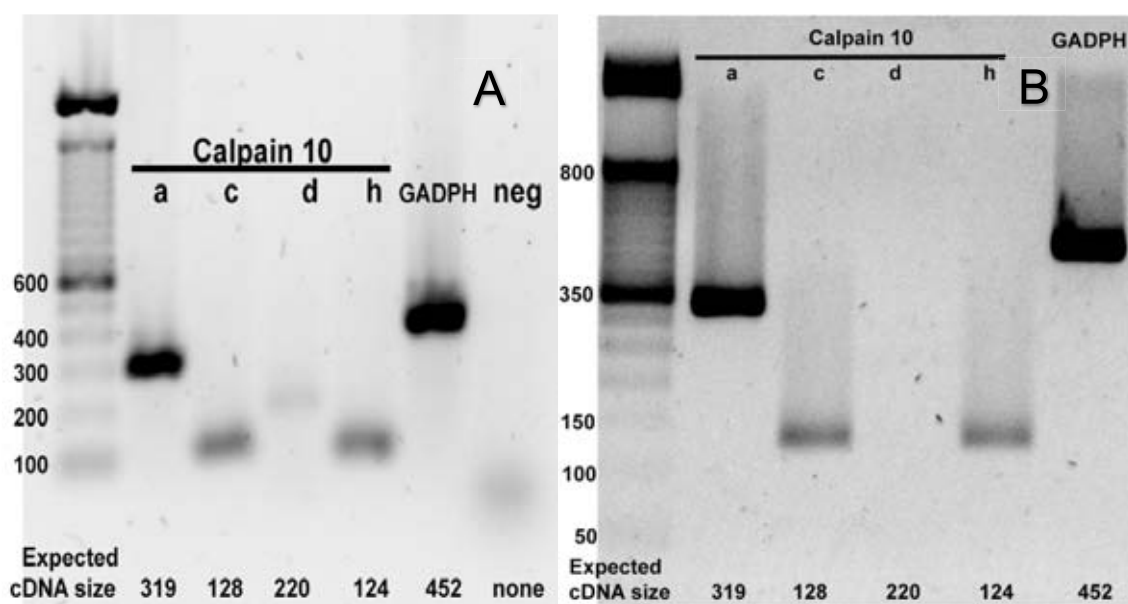


Fig. 5. Analisis del perfil de expresión de CAPN10. Amplificación de los cDNAs de N1E-115 (A) y cerebro (B) Se observa el mRNA de CAPN10 más un control positivo que es GADPH y un control negativo sin cDNA. Los números indican el tamaño esperado para cada una de las isoformas (figura 1).

En la figura 6 se puede observar el análisis de PCR en tiempo real, el cual, se explica en el anexo 3. El umbral de detección se alcanza más rápido cuando el número de copias de cDNA inicial es mayor, ya que con cada ciclo de amplificación cada cadena se duplica alrededor de 1.6 veces. De esta manera nuestro análisis muestra que el mRNA de la isoforma CAPN 10a es más abundante en células N1E-115, alcanzando el ciclo umbral alrededor de los 19 ciclos y la isoforma CAPN 10d se expresa relativamente con menor abundancia (umbral 29 ciclos), el mRNA de CAPN 10 c y h se presentan en niveles moderados (23 ciclos) con 5mM de glucosa.

Las curvas presentadas en la figura 6 representan la fluorescencia relativa contra el número de ciclos, cada curva es el promedio de cuatro experimentos, la gráfica está representada en escala logarítmica con los datos normalizados sobre el valor máximo de fluorescencia (Solver, Excel 2013) y con un ciclo umbral del 5% ya que en este punto los datos se encuentran lineales. En el grupo control se figuraba que CAPN 10a se detecta cuatro ciclos antes que las demás isoformas.

Las mismas isoformas se observan en las condiciones experimentales de alta y baja glucosa lo que descarta un efecto de regulación negativa sobre la expresión de estas isoformas (figura 6b). Más aun, el umbral de detección es menor para dos de estas isoformas y esto se observa mejor en la figura 7 en donde se gráfica cada uno de los mRNAs de las isoformas en alta y baja glucosa.

El umbral de detección se alcanza con menos ciclos lo que implica un aumento en la abundancia del cDNA, ya que, se parte de un mayor número de copias de lo que se desea amplificar (anexo 3).

Se observa una relación entre el aumento en la concentración de la glucosa y la tendencia del incremento de los distintos mRNAs de las calpaínas, se ha visto la presencia del mRNA en distintos tejidos como lo es el bazo, hígado, riñón, lente, corazón, musculo, retina, pulmón entre otros tejidos de rata, ratón y humano en respuesta a una hiperglucemia (Ma, *et al.*, 2001 y Horikawa, *et al.*, 2000).

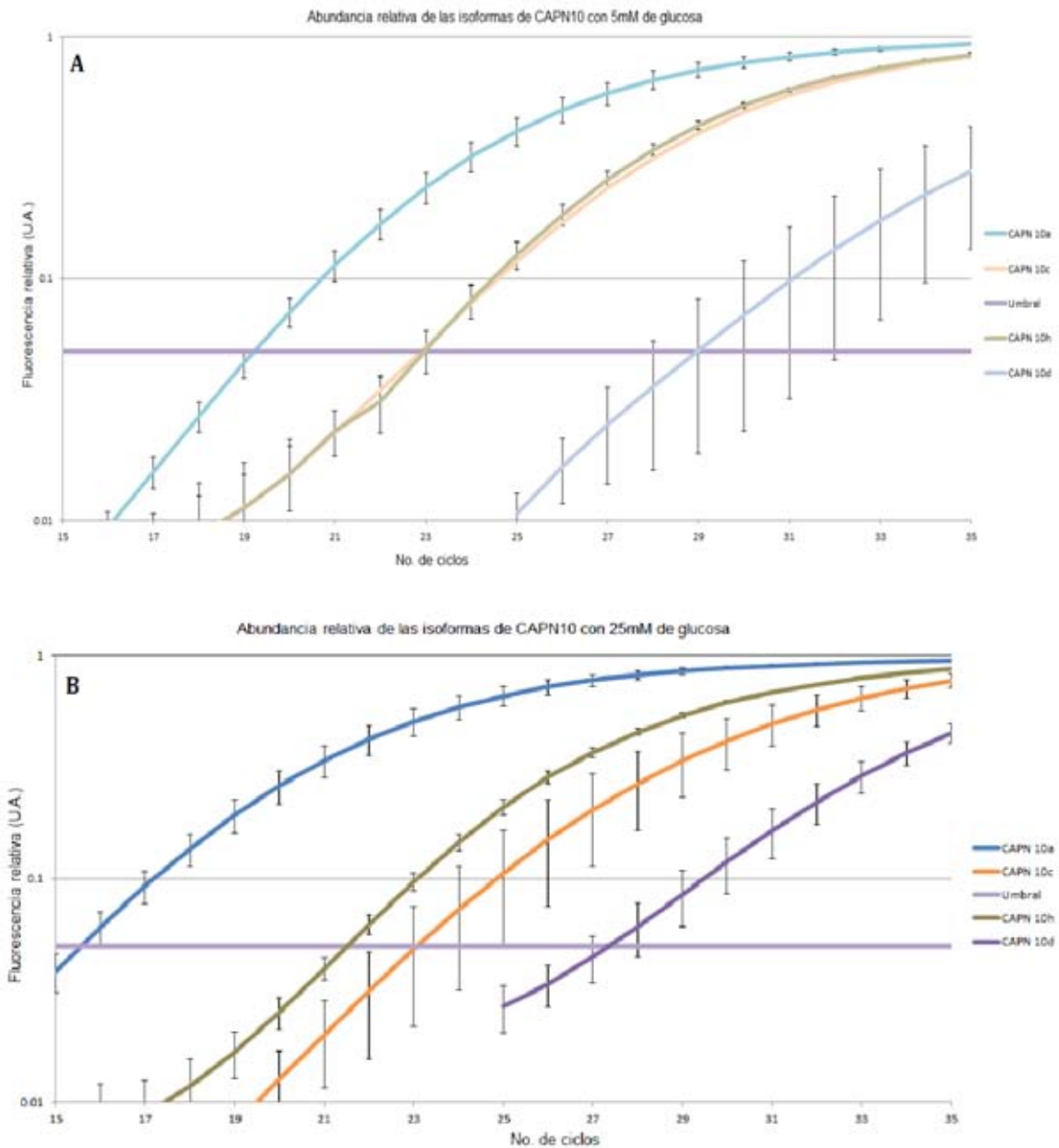


Fig. 6. **Niveles relativos de mRNA's de CAPN10.** Se analizaron mediante PCR en tiempo real de cuatro extracciones diferentes de RNA total de células de neuroblastoma N1E-115, cultivadas con 5mM (A) y 25mM (B) de glucosa. Se muestra que el cDNA de las calpaínas c y h en condiciones normales tienen un comportamiento parecido entre ellas, mientras que el cDNA de 10a tiene una amplificación más rápida y, por el contrario, el cDNA de la calpaína 10d se amplifica con mucho menor eficacia (A). Los mismos cDNAs con el mismo orden de amplificación se detectan en las células tratadas con alta glucosa (B).

En la figura 7 observamos que en las células N1E-115 tratadas con 25 mM de glucosa hay una tendencia a incrementar la expresión del mRNA de las distintas isoformas ya que se alcanza el ciclo umbral más rápido. La CAPN10 h se expresa notablemente más en la situación experimental con respecto a su control (figura 7b). La CAPN 10c permanece sin ningún cambio aparente (figura 7c). La CAPN 10a aumenta considerablemente, ya que, alcanza el ciclo umbral alrededor de entre los 15 ciclos en contraste con el control que alcanza el ciclo umbral en el ciclo 19 (Figura 7a). La CAPN 10d es el mRNA que se expresa con menos abundancia tanto en la situación control como en la experimental (figura 7d). Estos resultados sugieren que el efecto de la exposición de la glucosa es selectivo sobre algunas variantes de *splicing* de CAPN10.

La figura 7a nos presenta una comparación del mRNA de CAPN 10a, se observa que hay una mayor expresión de las células N1E-115 adicionadas con 25 mM de glucosa, con una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.0118$). Esto sugiere que en respuesta en una elevación de glucosa se empieza a transcribir más mRNA de calpaína 10a.

En la figura 7c se gráfica los valores promedio de la expresión de CAPN 10c, se puede observar, que en comparación con el control, la Fluorescencia relativa de mRNA de CAPN 10c en condiciones de alta glucosa tiende a aumentar ligeramente en las células tratadas con respecto al control (5mM de glucosa), pero no se afecta la sensibilidad de las células N1E-115. Este cambio de expresión no es estadísticamente significativo ($p=0.1136$).

Al analizar a CAPN 10d encontramos que su abundancia es muy baja ya que en condiciones control se encuentra a los 29 ciclos de la reacción de PCR en tiempo real y en condiciones experimentales (25mM de glucosa) no aumenta significativamente ($p=0.4323$). Esto podría deberse a que este *splicing* alternativo se transcribe con mucho menos frecuencia que las demás isoformas

Para determinar la magnitud del aumento se realizó un análisis tipo $(1+eff)^{-\Delta C_t}$ de acuerdo con Livak y Sshmittgen (2001)

Para este análisis se calculó la eficiencia de la amplificación para cada especie de mRNA Tabla 4.

Tabla 4. Eficiencia de amplificación	
mRNA	Eficiencia de amplificación±SD
CAPN 10a	1.57±0.056
CAPN 10c	1.56±0.111
CAPN 10d	1.42±0.041
CAPN 10h	1.59±0.064

Por cada ciclo que disminuye el CT la abundancia del RNA original aumenta alrededor de 1.6 veces.

El termino $- \Delta \Delta CT$ es el valor del CT de cada muestra de mRNA menos el CT promedio del control, en otras palabras se comparó el umbral de amplificación de cada muestra de RNA contra el valor promedio obtenido en el grupo control. Como se observa en la figura 8, a primera vista parece que el grupo control tiene una entrada menor de mRNA de CAPN10 de todas las isoformas pero cuando se realiza el análisis estadístico se puede ver que solo dos isoformas son las que tienen una diferencia significativa. CAPN10a aumenta 2.5 veces ($p=0.012$) y CAPN10h aumenta 1.7 veces ($p=0.0104$).

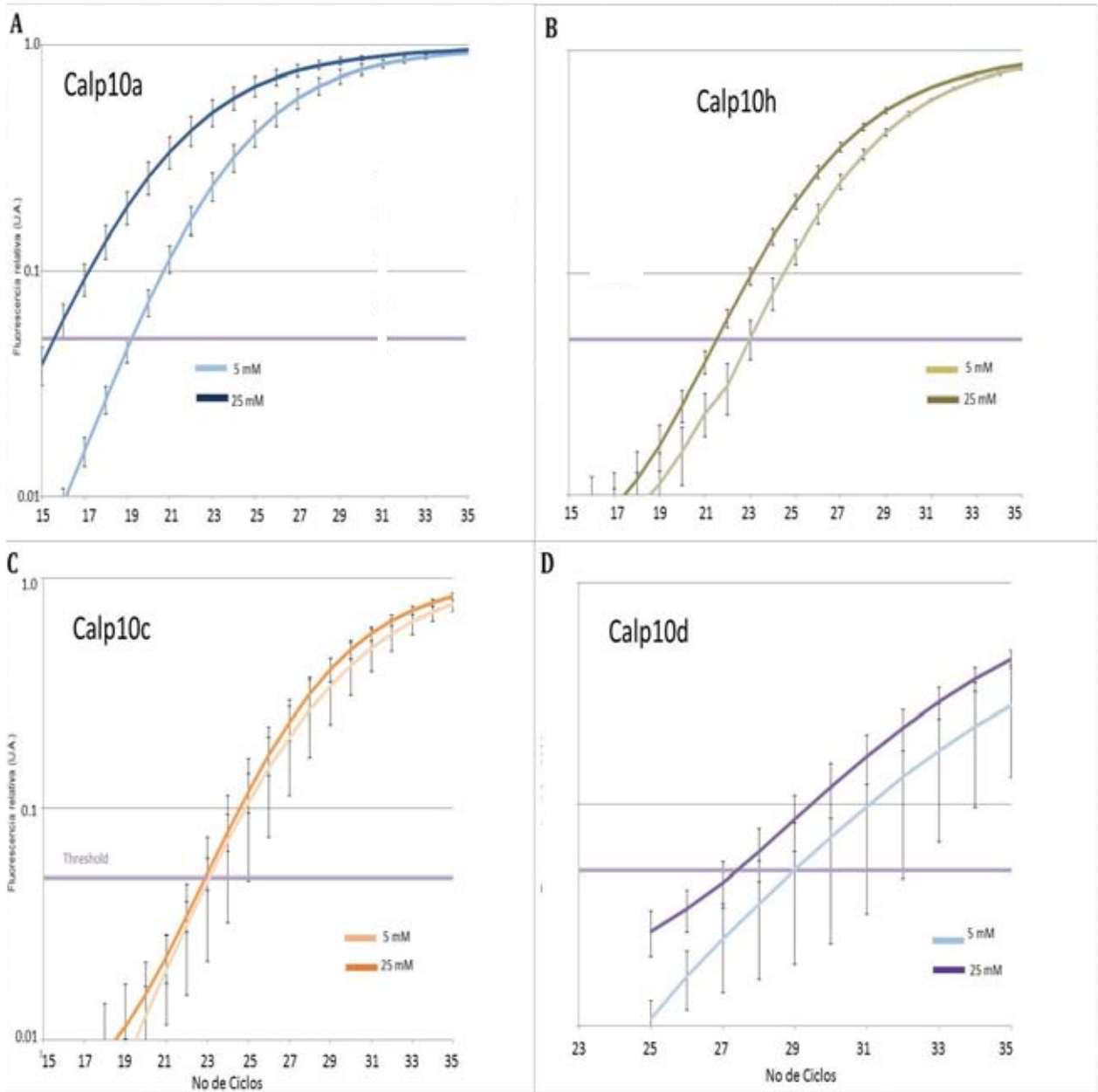


Fig. 7. Los mRNAs de Calpaína 10 son afectados diferencialmente en las células N1E-115 en condiciones de alta glucosa. Se analizaron mediante PCR en tiempo real tres lotes diferentes de RNA total de células N1E-115 cultivadas en condiciones con baja (5mM) y alta glucosa (20 mM). El tratamiento con alta glucosa induce un incremento en la expresión de las calpaínas 10 a y 10h (A y B). En contraste, las isoformas de Calpaína 10 c y d permanecen sin cambio (C y D).

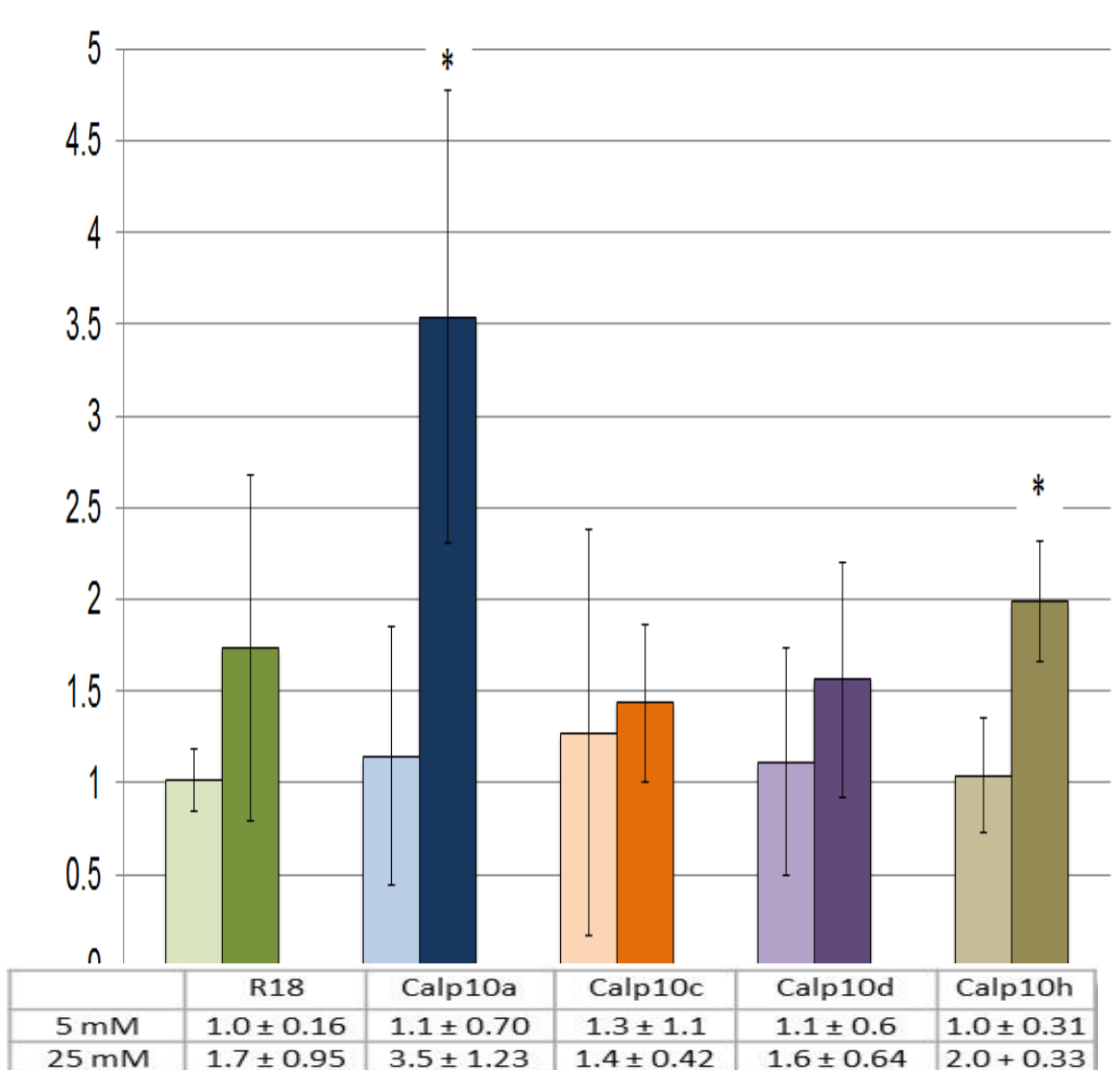


Fig. 8. **Los mRNAs de calpaína10 se expresan de manera diferenciada en las células N1E-115.** Con cada par de *primers* y cada lote de RNA se efectuó una reacción de RT y subsecuentemente una de PCR en tiempo real, los resultados obtenidos se sumaron y se obtuvo su media y su error estándar. Los asteriscos representan cambios estadísticamente significativos con respecto a los controles. Como se ve en la gráfica, la glucosa parece estimular de manera general la transcripción de mensajeros en el mRNA, sin embargo, el efecto en la transcripción de calpaína 10a es más acentuado (Media ± DS)

8. DISCUSIÓN

Por medio de técnicas de biología molecular, se han identificado 8 isoformas de CAPN10 en distintos tejidos (Cerebro, hígado, musculo esquelético, corazón, riñón, lente, páncreas, pulmón, etc.) de roedores y humanos y cultivo celular de células nerviosas de roedor (Horikawa *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2001; Gafni *et al.* 2004). De estas ocho isoformas solo cuatro contienen el dominio T, donde se encuentra el C- terminal que presumiblemente interactúa con las proteínas blanco (Arratia-Cortés *et al.*, 2014). Con base a estos datos se realizó la primera parte de investigación, la cual fue identificar los mRNAs de estas cuatro isoformas de CAPN10, en tejido nervioso.

De esta manera, en el perfil de expresión encontramos que los cuatro mRNAs de las isoformas de CAPN10 (a, c, d y h), la CAPN10 se expresa tanto en cerebro de ratón como en células de neuroblastoma N1E-115.

En estudios previos realizados con diversas técnicas, Ma *et al.*, en 2001 reportaron la presencia del mRNA de CAPN10a en diversos tejidos analizados (cristalino, cerebro, corazón, riñón, hígado, lente, musculo, bazo, estómago y retina) en ratas, observaron que el cerebro expresa mayores niveles de mRNA de CAPN10a. Por otro lado Horikawa *et al.*, en el 2000 reportaron que por medio de PCR en tiempo real se identificaron 8 variantes de *splicing* alternativo de CAPN10, siendo CAPN 10a la isoforma más abundante en el corazón, seguido por cerebro, placenta, pulmón, hígado, músculo esquelético, riñón y páncreas. La calpaína-10c y 10g son transcritos fáciles de detectar en muchos tejidos, incluyendo el músculo esquelético y los islotes pancreáticos, y mRNA calpaína-10h está presente en niveles moderados en islotes, pero no en cualquier otro tejido probado, en controversia nosotros encontramos que esta isoforma se expresa en cerebro de ratón y en células N1E-115. Las otras formas, la calpaína-10b, 10d, 10e y 10f parecen mucho menos abundante.(Horikawa *et al.*, 2000).

Los datos presentados anteriormente proporcionan evidencia de la expresión del mRNA de calpaína 10 en el ratón, la rata, y tejidos humanos, pero no hay datos proporcionados hasta ahora de que isoformas de calpaína 10 se encuentran en

cerebro o no son totalmente claros. Nuestros datos de PCR en tiempo real demuestran que los mRNAs de las cuatro isoformas analizadas de calpaína 10 se expresan tanto en cerebro como en células de neuroblastoma.

La calpaína 10a, junto con M y μ -calpaínas (calpaínas 1 y 2; (Ma *et al.*, 2000, se expresa de forma ubicua, ya que se expresa en los tejidos adultos y fetales humanos examinados por Ma *et al.*, (cristalino, corazón, cerebro, pulmón, retina, estómago, músculo, hígado, riñón y bazo; y su expresión ubicua ha sido confirmada en la rata y el ratón (Ma *et al.*, 2001). Esta expresión no es igual en todos los tejidos, pues el nivel del mensaje varía, pero es más alta en el corazón, seguido por el cerebro, el hígado, el riñón y el páncreas en seres humanos (Suzuki *et al.*, 2004).

Se ha visto que la activación de la calpaína se produce en los axones y cuerpos celulares neuronales de todo el cerebro después de una lesión traumática del cerebro y la médula espinal, accidente cerebrovascular, y dentro de un gran número de enfermedades neurológicas degenerativas (Saatman *et al.*, 1996, Siman *et al.*, 1996, Vosler *et al.*, 2008). A pesar del reconocimiento de que la calpaína participa en eventos patológicos de lesiones cerebrales traumáticas, los mecanismos que provocan la activación de la calpaína, la distribución subcelular de calpaína activada, y los objetivos específicos de esta activación están poco definidos.

Un punto de regulación potencialmente importante que vale la pena estudiar a futuro, es la mitocondria, porque son clave en el almacenamiento en búfer del influjo de calcio a través de receptores de NMDA (Peng y Greenamyre 1998), participan en la homeostasis del calcio (Babcock *et al.* 1997), y contiene a la calpaína (Pérez-Martínez, 2011).

Por otro lado, von Reyn *et al.*, (2012) demostraron que la activación de la calpaína y la posterior proteólisis de subunidades α de los canales de sodio son disparados por la activación de receptores NMDA. La activación de calpaína se produce a lo largo de la neurona lesionada, provocando una proteólisis de los canales de sodio sustancial en los tractos axonales. Por lo cual, es relevante investigar si existe una

relación entre la calpaína 10 y los canales de sodio dependientes de voltaje en respuesta a la elevación de la glucosa, y si esto puede producir dolor neuropático.

La diabetes es una enfermedad metabólica común, que conduce a enfermedades crónicas tales como la ya mencionada neuropatía, nefropatía, enfermedad vascular asociada con el corazón, los riñones, el cerebro, vasos sanguíneos periféricos y la retinopatía (Sedaghat *et al.*, 2011), pero no se conoce que es lo que causa la mayoría de estos padecimientos.

Turner *et al.*, demostraron que las calpaínas también están involucrados en el proceso de remodelación del citoesqueleto, en caso particular la calpaína 10, la cual facilita la reorganización de actina durante la secreción de insulina estimulada por glucosa en células β pancreáticas (Turner *et al.*, 2007).

No sabemos si los mRNAs de las diferentes isoformas de Calpaína 10 se traducen con la misma eficiencia en proteínas funcionales. No obstante con base en la abundancia relativa de los mRNAs y en observaciones de otros autores, se pueden realizar algunas inferencias, por ejemplo se esperaría que la isoforma CAPN 10a se traduzca con gran eficacia, ya que, su mRNA es uno de los más abundantes, y que también sea regulada positivamente en distintos tejidos en un modelo animal de diabetes tratados con estreptozotocina, este es uno de los aspectos a investigar en estudios posteriores.

También se esperaría un aumento en la actividad de calpaína 10 con respecto a dolor neuropático. Por ejemplo, datos de laboratorio muestran que la Calpaína 10 puede interactuar con canales de sodio dependientes de voltaje y esto puede llevar a una falta de excitabilidad en ciertas neuronas involucradas con la nocicepción, aunado a esto, recientemente se han detectado tres isoformas de las nueve de canales de sodio dependientes de voltaje que están implicadas en la generación y conducción de potenciales de acción a lo largo de la vía nociceptiva (Waxman y Zamponi, 2014) que han sido reconocidos para causar neuropatías dolorosas (Hoeijmakers *et al.*, 2012).

Por otro lado se ha demostrado que la inhibición de calpaína, inhibe la muerte neuronal excitotóxica *in vitro* (Caba *et al.*, 2002 y Ray *et al.*, 2006) y que las calpaínas también pueden iniciar la apoptosis neuronal a través de procesamiento de varias proteínas pro-apoptóticas (Raynaud y Marcilhac, 2006).

Por otra parte cabe resaltar que Simpson *et al.*, (2011), demostraron que la expresión del mRNA de CAPN10 se correlaciona positivamente con los niveles de la patología del tipo de Alzheimer en el envejecimiento del cerebro por medio de la técnica de microarreglos, y en un estudio previo proporcionan nuevas pruebas de que los astrocitos expresan CAPN10 en el SNC (Garwood *et al.*, 2013). Nosotros en el presente trabajo, corroboramos que el mRNA de CAPN10 se expresa en células de neuroblastoma N1E-115 del sistema nervioso central de ratón, pero no solo este mRNA de la isoforma larga (CAPN10a) de CAPN10 si no otras variantes de *splicing*.

9. Conclusiones

- Las células de neuroblastoma N1E-115 expresan múltiples mRNAs de calpaína10.
- El análisis de PCR en tiempo real confirma los resultados de PCR en punto final, y nos dice que la transcripción de la CAPN 10a es la isoforma significativamente más abundante, seguida de CAPN 10h y CAPN 10c, y por último la CAPN 10d es una isoforma muy poco expresada.
- La glucosa regula positivamente a la CAPN 10a y CAPN 10 h, mientras que a las otras dos isoformas no les afecta significativamente. Es decir, el tratamiento con alta glucosa (25mM) regula independientemente a cada una de los mRNAs de las isoformas de calpaína10.
- La expresión del mRNA de CAPN 10h tuvo un aumento estadísticamente significativo ($p=.0057$) con el tratamiento con alta glucosa, lo que es dos veces su expresión con respecto al control.
- Como se puede observar la CAPN 10a tiene un aumento significativo ($p=0.0057$) con el tratamiento de alta glucosa, esto puede deberse a que es la isoforma completa y podría tener mayor actividad en respuesta a la glucosa.

10 REFERENCIAS

- Arratia-Cortés, L.M., Vilches-Flores A., Vega A.V. (2014) Up-regulation of calpain 10a in response to glucose and its possible interaction with sodium channels. Washington DC. November 15-19. Society for Neuroscience, 2014. Abstract 16878.
- Arrington D.D, Van Vleet T.R., Schnellmann R.G, (2006). Arrington Calpain 10 a mitochondrial calpain and its role in calcium-induced mitochondrial dysfunction Am. J. Physiol. Cell Physiol. 291 1159-1171.
- Aslam A., Singh J. and Rajbhandari S., (2014), Pathogenesis of painful diabetic neuropathy, Pain Research and Treatment. p 7.
- Baier LJ, Permana PA, Yang X, Pratley RE, Hanson RL, Shen G-Q, Mott D, Knowler WC, Cox NJ, Horikawa Y, Oda N, Bell GI, Bogardus C (2000): A calpain-10 gene polymorphism is associated with reduced muscle mRNA levels and insulin resistance. *J Clin Invest* 106:R69–R73,
- Bano, D., Young, K.W., Guerin, C.J., Lefevre, R., Rothwell, N.J., Naldini, L., Rizzuto, R., Carafoli, E. and Nicotera, P. (2005) Cleavage of the plasma membrane Na⁺/Ca²⁺ exchanger in excitotoxicity. *Cell* 120, 275–285.
- Biswas, S., Harris F., Dennison S., Singh J.P., Phoenix D., (2005), Calpains: enzymes of vision? *Med. Sci. Monit.* 11, 301–310.
- Bodhini D, Radha V, Ghosh S., Sanapalab K.R., Majumderb P.P., Satyanarayana M.R.R., Mohan V., (2011), Association of calpain 10 gene polymorphisms with type 2 diabetes mellitus in Southern Indians., *Metabolism*; 60:681-688.
- Braun C, Engel M, Theisinger B, Welter C, Seifert M (1999)., CAPN 8: Isolation of a new calpain-isoenzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 260:671–675.
- Caba E., Brown Q.B., Kawasaki B., Bahr B.A., (2002), Peptidyl alpha keto amide inhibitor of calpain blocks excitotoxic damage without affecting signal transduction events. *J Neurosci Res*; 67: 787–94.
- Carragher, N. O., (2007). In: *Methods in Molecular Biology*. 370, p. 109-20 12
- Covington M. and Schnellmann R., (2012), Chronic high glucose downregulates mitochondrial calpain 10 and contributes to renal cell death and diabetes-induced renal injury. *Kidney Int.* 81:391-400.

- Croall D.E. and Ersfeld K., (2007), The calpains: modular designs and functional diversity. *Genome Biology*, 8: 218.1-218.11.
- Croall, D.E. and DeMartino, G.N., (1991), Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation. *Physiol. Rev.* 71, 813–847.
- Daimon, M. Oizumi T., Saitoh T., Kameda W., Yamaguchi H., Ohnuma H., Igarashi M., Manaka H. and Kato T., (2002), Calpain 10 gene polymorphisms are related, not to type 2 diabetes, but to increased serum cholesterol in Japanese. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 56, 147–152.
- Dear T. N. and Boehm T., (2001), Identification and characterization of two novel calpain large subunit genes. *Gene* 274, 245–252.
- Dear, T.N. Meier, N., Hunn, M., Boehm, T., (2000), Gene structure, chromosomal localization, and expression pattern of Capn12, a new member of the calpain large subunit gene family. *Genomics* 68, 152–160.
- Dear, T.N. Moller, A., Boehm, T., (1999) CAPN11: A calpain with high mRNA levels in testis and located on chromosome 6. *Genomics* 59, 243–247
- Dear, N. Matena, K., Vingron, M., Boehm, T., (1997) A new subfamily of vertebrate calpains lacking a calmodulin-like domain: implications for calpain regulation and evolution. *Genomics* 45, 175–184.
- Deluca, C. I., Davies, P. L., Samis, J. A., and Elce, J. S. (1993) Molecular cloning and bacterial expression of cDNA for rat calpain II 80 kDa subunit *Biochim. Biophys. Acta* 1216, 81–93
- Demirci H, Yurtcu E, Ergun M, Canan A.Y., Karasu C., and Yetkin I., (2008). Calpain 10 SNP-44 gene polymorphism affects susceptibility to type 2 diabetes mellitus and diabetic-related conditions. *Genet Test*; 12: 305-310.
- Evans J.C., Frayling T.M., Cassell P.G., Saker P.J., Hitman G.A., Walker M., Levy J.C., O'Rahilly S., Rao P.V., Bennett A.J., Jones E.C., Menzel S., Prestwich P., Simecek N., Wishart M., Dhillon R., Fletcher C., Millward A., Demaine A., Wilkin T., Horikawa Y., Cox N.J., Bell G.I., Ellard S., McCarthy M.I., Hattersley A.T., (2001), Studies of association between the gene for calpain- 10 and type 2 diabetes mellitus in the United Kingdom. *Am J Hum Genet*; 69:544-552.

- Ezzidi I, Turki A, Messaoudi S, Chaieb M., Kacem M, Al-Khateeb G.M., Mahjoub T., Almawi W.Y. and Mtiraoui N., (2010). Common polymorphisms of calpain-10 and the risk of type 2 diabetes in a Tunisian Arab population: a case-control study. *BMC Med Genet*; 11:1-8.
- Franz, T. Vingron, M., Boehm, T., Dear, T.N., (1999) Capn7: a highly divergent vertebrate calpain with a novel Cterminal domain. *Mamm. Genome* 10, 318–321.
- Gafni, J. and Ellerby, L.M. (2002) Calpain activation in Huntington's disease. *J. Neurosci.* 22, 4842–4849
- Gafni, J. Hermel E., Young J. E., Wellington C. L., Hayden M. R. and Ellerby L., (2004), Inhibition of calpain cleavage of huntingtin reduces toxicity: accumulation of calpain/caspase fragments in the nucleus. *J. Biol. Chem.* 279, 20211–20220
- Garwood C, Faizullahoy A, Wharton S, Ince P. G., Heath P. R., Shaw P. J., Baxter L., Gelsthorpe C., Forster G., Matthews F. E., Brayne C. and Simpson J. E., (2013). Calcium dysregulation in relation to Alzheimer-type pathology in the ageing brain. *Neuropathol Appl Neurobiol*; 39, 788-799.
- Goll D. E., Thompson V. F., Li H. , Wei, W. and Cong J., (2002), The calpain system. *Physiol Rev*; 83(3): 731-801.
- Goll D.E, Thompson V.F., Li H., Wei W., Cong J., (2003), The calpain system, *Physiol. Rev.* 83 731–801.
- González A., Sáez M.E., Aragón M.J., Galán J.J., Vettori P., Molina L., Rubio C., Real L.M., Ruiz A., Ramírez-Lorca R., (2006), Specific haplotypes of the CALPAIN-5 gene are associated with polycystic ovary syndrome. *Hum. Reprod.* 21, 943–951
- Gonzalez, A. Abril E., Roca A., Arago M. J. N., Figueroa M.J., Velarde P., Royo J. L., Real L. M. and Ruiz A.N., (2002) CAPN10 alleles are associated with polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 3971–3976.
- Guroff G (1964) A neutral, calcium-activated proteinase from the soluble fraction of rat brain. *J Biol Chem* 239:149–55.
- Higuchi M., Iwata N., Saido T.C., (2005), Understanding molecular mechanisms of proteolysis in Alzheimer's disease: progress toward therapeutic interventions. *Biochim. Biophys. Acta* 1751, 60–67.

- Hoeijmakers J.G., Faber C.G., Lauria G., Merckies I.S., Waxman S.G.. (2012), Small-fibre neuropathies—advances in diagnosis, pathophysiology and management. *Nat Rev Neurol*; 8(7):369–79.
- Horikawa Y., Oda N., Cox N.J., Li X., Orho-Melander M., Hara M., Hinokio Y., Lindner T.H., Mashima H., Schwarz P.E.H., del Bosque-Plata L., Horikawa Y., Oda Y., Yoshiuchi I., Colilla S., Polonsky K.S., Wei S., Concannon P., Iwasaki N., Schulze J., Baier L.J., Bogardus C., Groop L., Boerwinkle E., Hanis C.L., Bell G.I., (2000) Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus, *Nat. Genet.* 26 163–175.
- Hosfield C.M., Elce J.S., Davies P.L., Jia Z., (1999), Crystal structure of calpain reveals the structural basis for Ca²⁺-dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation. *EMBO J* 18:6880–6889.
- Huang Y. and Wang K. K. (2001) The calpain family and human disease. *Trends Mol. Med.* 7, 355–362.
- Huseyin Demirci, Erkan Yurtcu, Mehmet Ali Ergun, Ayse Canan Yazici, Cimen Karasu, and Ilhan Yetkin. Genetic Testing, (2008), Calpain 10 SNP-44 Gene Polymorphism Affects Susceptibility to Type 2 Diabetes Mellitus and Diabetic-Related Conditions, 12(2): 305-309. doi:10.1089/gte.2007.0118.
- Huston R. B. and Krebs E. G. (1968) Activation of skeletal muscle phosphorylase kinase by Ca²⁺. II. Identification of the kinase activating factor as a proteolytic enzyme. *Biochemistry* 7, 2116–2122.
- Inoue K., Ohno M. and Shimura Y., (1995), Aspects of splice site selection in constitutive and alternative pre-mRNA splicing. *Gene Expression* 4:177–182.
- Johnson, J.D. Han Z., Otani K., Ye H., Zhang Y., Wu H., Horikawa Y., Misler S., Bell G.I., Polonsky K.S., (2004), RyR2 and calpain-10 delineate a novel apoptosis pathway in pancreatic islets. *J. Biol. Chem.* 279, 24794–24802.
- Kamei, M; Webb, G. C.; Young, I. G.; Campbell, H. D. (1998). SOLH, a human homologue of the *Drosophila melanogaster* small optic lobes gene is a member of the calpain and zinc-finger gene families and maps to human chromosome 16p13.3 near CATM *Genomics*, 51, 197-206.

- Kang, E.S. Nam M., Kim H.J., Kim H.J., Myoung S.M., Rhee Y., Ahn C.W., Cha B.S., Lee H.C., (2006), Haplotype combination of Calpain-10 gene polymorphism is associated with metabolic syndrome in type 2 diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 73, 268–275.
- Kar, P.; Samanta, K.; Shaikh, S.; Chowdhury, A.; Chakraborti, T. and Chakraborti, S., (2010), Mitochondrial calpain system An overview *Arch. Biochem. Biophys.*, 495, 1-7
- Kuwabara, P.E. and Perry, M.D., (2001), It ain't over till it's ova: germline sex determination in *C. elegans*. *Bioessays* 23, 596–604.
- Lee, H.J. Sorimachi H., Jeong S.Y., Ishiura S. and Suzuki K., (1998), Molecular cloning and characterization of a novel tissuespecific calpain predominantly expressed in the digestive tract. *Biol. Chem.* 379, 175–183.
- Lee, H.J., Tomioka S., Kinbara K., Masumoto H., Jeong S. Y., Sorimachi H., Ishiura S., Suzuki K. (1999) Characterization of a human digestive tract-specific calpain, nCL-4, expressed in the baculovirus system. *Arch. Biochem. Biophys.* 362, 22–31.
- Ling C, Groop L, Del Guerra S. and Lupi R., (2009) Calpain-10 expression is elevated in pancreatic islets from patients with type 2 diabetes. *PLoS One* 4:e6558.
- Logie L.J., Brown A.E., Yeaman S.J., Walker M., (2005) Calpain inhibition and insulin action in cultured human muscle cells, *Mol. Genet. Metab.* 85 54–60.
- Lynch, G. and Baudry, M. (1984) The biochemistry of memory: a new and specific hypothesis. *Science* 224, 1057–1063
- Lynn S., Evans J.C., White C., Frayling T.M., Hattersley A.T., Turnbull D.M., Horikawa Y., Cox N.J., Bell G.I. and Walker M., (2002), Variation in the calpain-10 gene affects blood glucose levels in the British population. *Diabetes*; 51:247-250.
- Ma H., Fukiage C., Kim Y.H., Duncan M.K., Reed N.A., Shih M., Azuma M., Shearer T.R., (2001), Characterization and expression of calpain 10. *J Biol Chem* 276:28525–28531.
- Markmann A., Schäfer S., Linz W., Löhn M., Busch A.E. and Wohlfart P., (2005), Down-regulation of calpain 9 is linked to hypertensive heart and kidney disease. *Cell. Physiol. Biochem.* 15, 109–116.

- Marshall C., Hitman G.A., Partridge C.J., Clark A., Ma H., Shearer T.R. and Turner M.D., (2005), Evidence that an isoform of calpain-10 is a regulator of exocytosis in pancreatic beta-cells. *Mol. Endocrinol.* 19, 213–224.
- Mishizen-Eberz A.J., Norris E.H., Giasson B.I., Hodara R., Ischiropoulos H., Lee V.M., Trojanowski J.Q. and Lynch D.R., (2005), Cleavage of alpha-synuclein by calpain: potential role in degradation of fibrillized and nitrated species of alpha-synuclein. *Biochemistry* 44, 7818–7829
- Moldoveanu T., Hosfield C.M., Lim D, Elce J.S., Jia Z. and Davies P.L., (2002), A Ca²⁺ switch align the active site of calpain. *Cell* 108:649–660.
- Neumar R.W., DeGracia D.J., Konkoly L.L., Khoury J.I., White B.C., Krause G.S., (1998), Calpain mediates eukaryotic initiation factor 4G degradation during global brain ischemia, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18 876–881.
- Nishimura T., Goll D.E., (1991), Binding of calpain fragments to calpastatin. *Biol Chem.* 266(18):11842-50
- Ohno S., Emori Y., Imajoh S., Kawasaki H., Kisaragi M., and Suzuki K. (1984) Evolutionary origin of a calcium-dependent protease by fusion of genes for a thiol protease and a calcium-binding protein? *Nature* 312, 566–570.
- Ono Y, Shimada H, Sorimachi H, Richard I, Saido TC, Beckmann JS, Ishiura S, Suzuki K., (1998), Functional defects of a muscle-specific calpain, p94, caused by mutations associated with limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *J Biol Chem* 273:17073–17078.
- Park, S.Y. and Ferreira, A., (2005), The generation of a 17 kDa neurotoxic fragment: an alternative mechanism by which tau mediates beta-amyloid-induced neurodegeneration. *J. Neurosci.* 25, 5365–5375.
- Paul D.S., Harmon A.W., Winston C.P., Pate Y.M., (2003) Calpain facilitates GLUT4 vesicle translocation during insulin-stimulated glucose in adipocytes, *Biochem. J.* 15 625–632.
- Perez-Martinez P, Delgado-Lista J, Garcia-Rios A, Perez-Martinez P., Delgado-Lista J., Garcia-Rios A., Ferguson J.F., Gulseth H.L., Williams C.M., Karlström B., Kieć-Wilk B., Blaak E.E., Helal O., Malczewska-Malec M., Defoort C., Risérus U., Saris W.H., Lovegrove J.A., Drevon C.A., Roche H.M., and Lopez-Miranda J.,

(2011). Calpain-10 interacts with plasma saturated fatty acid concentrations to influence insulin resistance in individuals with the metabolic syndrome. *Am J Clin Nutr.* 93:1136-1141.

- Permutt M.A., Bernal-Mizrachi E. and Inoue H., (2000), Calpain 10: the first positional cloning of a gene for type 2 diabetes? *J Clin Invest* 106:819–821.
- Ray S.K., Karmakar S., Nowak M.W., Banik N.L., (2006), Inhibition of calpain and caspase-3 prevented apoptosis and preserved electrophysiological properties of voltage-gated and ligand-gated ion channels in rat primary cortical neurons exposed to glutamate. *Neuroscience*; 139: 577–95.
- Ray, S.K., Hogan E.L. and Banik N.L., (2003), Calpain in the pathophysiology of spinal cord injury: neuroprotection with calpain inhibitors. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 42, 169-185.
- Raynaud F. and Marcilhac A., (2006), Implication of calpain in neuronal apoptosis. A possible regulation of Alzheimer's disease. *FEBS J*; 273: 3437–43.
- Reverter D., Strobl S., Fernandez-Catalan C., Sorimachi H., Suzuki K. and Bode W., (2001), Structural basis for possible calcium-induced activation mechanism of calpains. *Biol Chem* 382:753–766.
- Ribaldo R., Gilman M., Kingston R.E., Chomczynski P., Sacchi N., (2001) Preparation of RNA from tissues and cells. *Current Protocols in Neuroscience* (APPENDIX 1). 1-14.
- Richard I., Broux O., Allamand V., Fougousse F., Chiannikulchai N., Bourg N., Brenguier L., Devaud C., Pastuard P., Roudaut C., Hillaire D., Passos-Bueno M., Zatz M., Tischfield J.A., Fardeau M., Jackson C.E., Cohen D., Beckmann J. S. (1995) Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell* 81:27–40.
- Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., and Erlich H. A., (1988), Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science*, 239:487-491.
- Sedaghat R., Roghani M., Ahmadi M., Ahmadi F., (2011) Antihyperglycemic and antihyperlipidemic effect of *Rumex patientia* seed preparation in streptozotocin-diabetic rats, *Pathophysiology* 18: 111–115.

- Shin, S.J., Lee S.E., Boo J.H., Kim M., Yoon Y.D., Kim S.I. and Mook-Jung I., (2004), Profiling proteins related to amyloid deposited brain of Tg2576 mice. *Proteomics* 4, 3359–3368
- Simpson J.E., Ince P.G., Shaw P.J., Heath P.R., Raman R., Garwood C.J., Gelsthorpe C., Baxter L., Forster G., Matthews F.E., Brayne C., Wharton S.B., (2011), Microarray analysis of the astrocyte transcriptome in the aging brain: relationship to Alzheimer’s pathology and APOE genotype. *Neurobiol Aging*; 32: 1795–807.
- Skubitz, K.M. and Skubitz A.P., (2003), Differential gene expression in uterine leiomyoma. *J. Lab. Clin. Med.* 141, 297–308.
- Sokol, S.B. and Kuwabara, P.E. (2000) Proteolysis in *Caenorhabditis elegans* sex determination: cleavage of TRA-2A by TRA-3. *Genes Dev.* 14, 901–906
- Sorimachi H., Ishiura S. and Suzuki K., (1993), A novel tissue-specific calpain species expressed predominantly in the stomach comprises two alternative splicing products with and without Ca (2+)-binding domain. *J. Biol. Chem.* 268, 19476–19482.
- Sorimachi H., Ishiura S., and Suzuki K. (1997) Structure and physiological function of calpains. *Biochem. J.* 328, 721–732.
- Sorimachi H., Tsukahara T., Okada-Ban M., Sugita H., Ishiura S., and Suzuki K. (1995) Identification of a third ubiquitous calpain species-chicken muscle expresses four distinct calpains. *Biochim. Biophys. Acta.* 1261, 381–393.
- Strobl S., Fernandez-Catalan C., Braun M., Huber H., Masumoto H., Nakagawa K., Irie A., Sorimachi H., Bourenkow G., Bartunik H., Suzuki K. and Bode W., (2000), The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:588–592.
- Suzuki K., Hata S., Kawabata Y., Sorimachi H., (2004) Structure, activation, and biology of calpain, *Diabetes* 53. 12–18.
- Thurmond D.C., Gonelle-Gispert C., Furukawa M., Halban P.A., Pessin J.E., (2003) Glucose-stimulated insulin secretion is coupled to the interaction of actin with the t-SNARE (target membrane soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor protein) complex, *Mol. Endocrinol.* 17. 732–742.

- Turner M.D., Fulcher F.K., Jones C.V., Smith B.T., Aganna E., Partridge C.J., Hitman G.A., Clark A., Patel Y.M., (2007) Calpain facilitates actin reorganization during glucose-stimulated insulin secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 352: 650–655.
- Vanderklish, P.W. and Bahr B.A., (2000), The pathogenic activation of calpain: a marker and mediator of cellular toxicity and disease states. *Int. J. Exp. Pathol.* 81, 323–339.
- Von Reyn C.R., Spaethling J.M., Mesfin M.N., Ma M., Neumar R.W., Smith D.H., Siman R., Meaney D.F. (2009). Calpain mediates proteolysis of the voltage-gated sodium channel α -subunit. *J. Neurosci.* 29: 10350–10356.
- von Reyn, C. R., Mott, R. E., Siman, R., Smith, D. H. and Meaney, D. F. (2012), Mechanisms of calpain mediated proteolysis of voltage gated sodium channel α -subunits following in vitro dynamic stretch injury. *Journal of Neurochemistry*, 121: 793–805.
- Vosler P.S., Brennan C.S., Chen J., (2008) Calpain-mediated signaling mechanisms in neuronal injury and neurodegeneration. *Mol Neurobiol*; 38:78–100.
- Waghray A., Wang D.S., McKinsey D., Hayes R.L. and Wang K.K., (2004), Molecular cloning and characterization of rat and human calpain-5. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324, 46–51.
- Waxman SG, Zamponi GW. (2014). Regulating excitability of peripheral afferents: emerging ion channel targets. *Nat Neurosci.* 17(2):153–63.
- Weedon M.N., Schwarz P.E., Horikawa Y., Iwasaki N., Illig T., Holle R., Rathmann W., Selisko T., Schulze J., Owen K.R., Evans J., Del Bosque-Plata L., Hitman G., Walker M., Levy J.C., Sampson M., Bell G.I., McCarthy M.I., Hattersley A.T. and Frayling T.M., (2003), Meta-analysis and a large association study confirm a role for calpain-10 variation in type 2 diabetes susceptibility. *Am. J. Hum. Genet.* 73, 1208–1212.
- Wu M, Yu Z, Fan J, Caron A, Whiteway M, Shen SH (2006) Functional dissection of human protease mu-calpain in cell migration using RNAi. *FEBS Lett* 580:3246–56.

- Yokoyama Y., Narahara K., Tsuji K., Ninomiya S. and Seino Y., (1992) Autosomal dominant congenital cataract and microphthalmia associated with a familial t (2;16) translocation. *Hum. Genet.* 90, 177–178.
- Yoshikawa Y., Mukai H., Hino F., Asada K. and Kato I., (2000), Isolation of two novel genes, down-regulated in gastric cancer. *Jpn. J. Cancer Res.* 91, 459–463.
- Zhao P., Iezzi S., Carver E., Dressman D., Gridley T., Sartorelli V. and Hoffman E.P., (2002), Slug is a novel downstream target of MyoD. Temporal profiling in muscle regeneration. *J. Biol. Chem.* 277, 30091–30101.
- Zhou X., Wang Y., Zhang Y., Gao P. and Zhu D., (2010). Association of CAPN10 gene with insulin sensitivity, glucose tolerance and renal function in essential hypertensive patients. *Clin Chim Acta*; 411: 1126-1131.

11 ANEXOS

ANEXO 1

TRATAMIENTO DE CÉLULAS

Congelación. Dependiendo de la disponibilidad de suero, las células se pueden congelar en los siguientes medios: DMEM completo, DMEM con 20% suero, o en 100% suero, en cualquier caso suplementados con 10% di-metil-sulfóxido (DMSO), como agente crioprotector. El DMSO es bastante tóxico a esta concentración, habiendo células que lo soportan peor que otras. En cualquier caso, hay que minimizar el tiempo que las células pasan a temperatura ambiente en presencia de DMSO. Por ello, es conveniente enfriar las células a 4°C cuando se preparan para congelar. Al descongelar, diluir las células (que están en medio de congelación conteniendo DMSO) con DMEM completo, centrifugar y resuspender en DMEM completo. Se congelan un millón de células/ml, congeladas en alícuotas de 1ml.

Tras preparar esta suspensión y separar en alícuotas, las células se enfrían a 4°C y posteriormente se congelan a -20°C, 24h, -70°C, 24h y N₂ líquido (-170°C), indefinidamente.

Descongelación. Una vez que todo el material y medios estén preparados, se descongelan las células transfiriéndolas del N₂ líquido un baño maría a 37°C, agitando el criotubo en el agua con la mano hasta su completa descongelación. Rociar etanol abundantemente, transferir las células a un tubo con 10 ml medio completo, se transfieren las células en un volumen de medio adecuado y transferir al matraz cultivo. Se coloca la placa en la incubadora a 37°C, en una atmósfera con 5% CO₂ y 95% de humedad.

NOTA: al congelar y descongelar las células, la manipulación durante la congelación y descongelación es un proceso que conlleva el riesgo de contaminarlas. Habrá de prestarse especial atención a no tocar las roscas de los tapones del criotubo, y tras descongelar las células en el baño, es esencial esterilizar el exterior del tubo con abundante etanol, antes de abrirlo y manipularlo.

Cambios de medio. La mayoría de líneas celulares doblan en cultivo en 24-48h, cuando las condiciones de crecimiento son adecuadas. De esta manera, el número de células se multiplica en cualquier cultivo en unos pocos días, ocupando toda la superficie de la placa (en el caso de células adherentes), y empobreciendo el medio al consumirse los nutrientes y acumularse productos de deshecho en éste.

Tripnización. Son distintos los métodos para pasar células, en este caso de línea celular que crecen adheridas a un sustrato, la forma más conveniente de levantarlas en una suspensión celular (para poder manejarlas fácilmente en suspensión), es mediante el uso de tripsina (proteasa), que digiere aquellas proteínas celulares implicadas en la adhesión celular al soporte. El material empleado en este procedimiento se enlista en el cuadro 5.

Cuadro 4. Medio DMEM completo de proliferación

Concentración	Reactivo	Marca
89%	DMEM alta y baja glucosa	Gibco
10%	FBS	Gibco
2mM	L-Glutamine	Gibco
1X	Pen/Strep	Gibco

Procedimiento:

- Retirar el medio de cultivo
- Lavar una vez con 15 ml de PBS/EDTA.
- Incubar con 1.5 ml solución de Trip / EDTA, 5 min, RT ó 37°C (si es posible), hasta que las células se vean redondas bajo el microscopio, señal de que su adherencia está muy disminuida.

- Diluir la tripsina / EDTA en la placa con 13 ml de medio completo (con suero); esto detiene la tripsinización (por el aporte de proteínas del suero, el inhibidor de tripsina presente en el suero, y el aporte de Calcio y Magnesio con el medio y el suero). Además, en el volumen final de 15 ml es fácil pipetear la suspensión para acabar de levantar la células (pipetear arriba y abajo, esparciendo la suspensión por toda la superficie de la placa, unas 5-10 veces, evitar hacer vacío al pipetear, así como no hacer demasiadas burbujas, ya que ambas cosas matan muchas células).
- Si la tripsinización ha sido efectiva, todas las células de la placa se encontrarán en los 15 ml de suspensión, como células aisladas, no como agregados.

Cuadro 5. Reactivos y material para Tripsinización
1X Tripsina/EDTA
Medio DMEM completo
1X PBS estéril
2 tubos cónicos o de cultivo
1 matraz de 75cm ² para cultivo
1 pipeta Pasteur siliconizada unida a trampa de vacío
2 pipetas de 5 ml
Puntas azules
Puntas amarillas
Pipetas de 200 y 1000 µl
Cámara Neubauer (Hematocitómetro)
Microscopio

Recuento de células

Para mantener unas condiciones de cultivo reproducibles entre pases y experimentos, es recomendable sembrar las células a la misma densidad, lo cual supone la necesidad de conocer el número de células en la suspensión preparada.

La manera más común de determinar el número de células es contando éstas en un microscopio con ayuda de una cámara de Neubauer. Para reducir el error de recuento se habrá de contar tantos cuadrados como sean necesarios para al menos acumular un mínimo de 100 células en total. Teniendo en cuenta las diluciones realizadas, es inmediato llegar a saber el número total de células en los 15 ml de suspensión.

ANEXO 2

- Lavar cultivo con PBS 1X y desechar
- Agregar 2ml de TRIzol y limpiar con policía
- Incubar 15 min a temperatura ambiente
- Recolectar las células en tubos eppendorf
- Se agregan 200µl de cloroformo grado molecular, se agitan por 10 min en vortex
- Centrifugar a 1,500 rpm por 15 min
- Se agrega un volumen igual al recuperado de isopropanol y se deja reposar toda la noche a -20°C
- Centrifugar por 10 min a 13,000 rpm
- Recuperar la pastilla, agregar 1ml de etanol grado biología molecular, mover ligeramente
- Centrifugar a 13,000 rpm por 5 min
- Dejar que se evapore el etanol (alrededor de 5 min) y resuspender en 30µl de agua-DEPC (dietil pirocarbonato)

EXTRACCIÓN DE RNA DE ÓRGANOS

Para este procedimiento solo se obtienen 100mg de tejido por cada ml de Trizol, macerando homogéneamente y se continúa con el paso 1° de extracción de RNA.

PURIFICACIÓN DE RNA

- Agregar un volumen de agua-DEPC hasta llevar a 240µl
- Añadir 240µl de Fenol: Cloroformo :alcohol isoamílico (25:24:1)
- Mover en el vortex y centrifugar a 12,000g por 10 min a 4°C
- Recuperar fase acuosa y adicionar 0.1 volumen del recuperado de acetato de sodio 3M, pH 7.2 ± 2 y 2.5 volúmenes de etanol al 100%
- Incubar a -70°C por una hora
- Centrifugar a 16,000g por 10 min a 4°C
- Retirar el sobrenadante y lavar con 1ml de eatnol al 70%
- Centrifugar a 12,000g por 8 min a 4°C
- Dejar secar el etanol (alrededor de 20min)

- Resuspender en agua DEPC

CUANTIFICACIÓN DE RNA

- Diluir la muestra 1:300
- Leer absorbancia (abs) a 260nm
- Calcular la concentración: $\frac{\text{abs}_{260\text{nm}} \cdot \text{factor de dilución} \cdot \text{DORNA}}{1000\mu\text{l}}$ donde:

Factor de dilución: 300

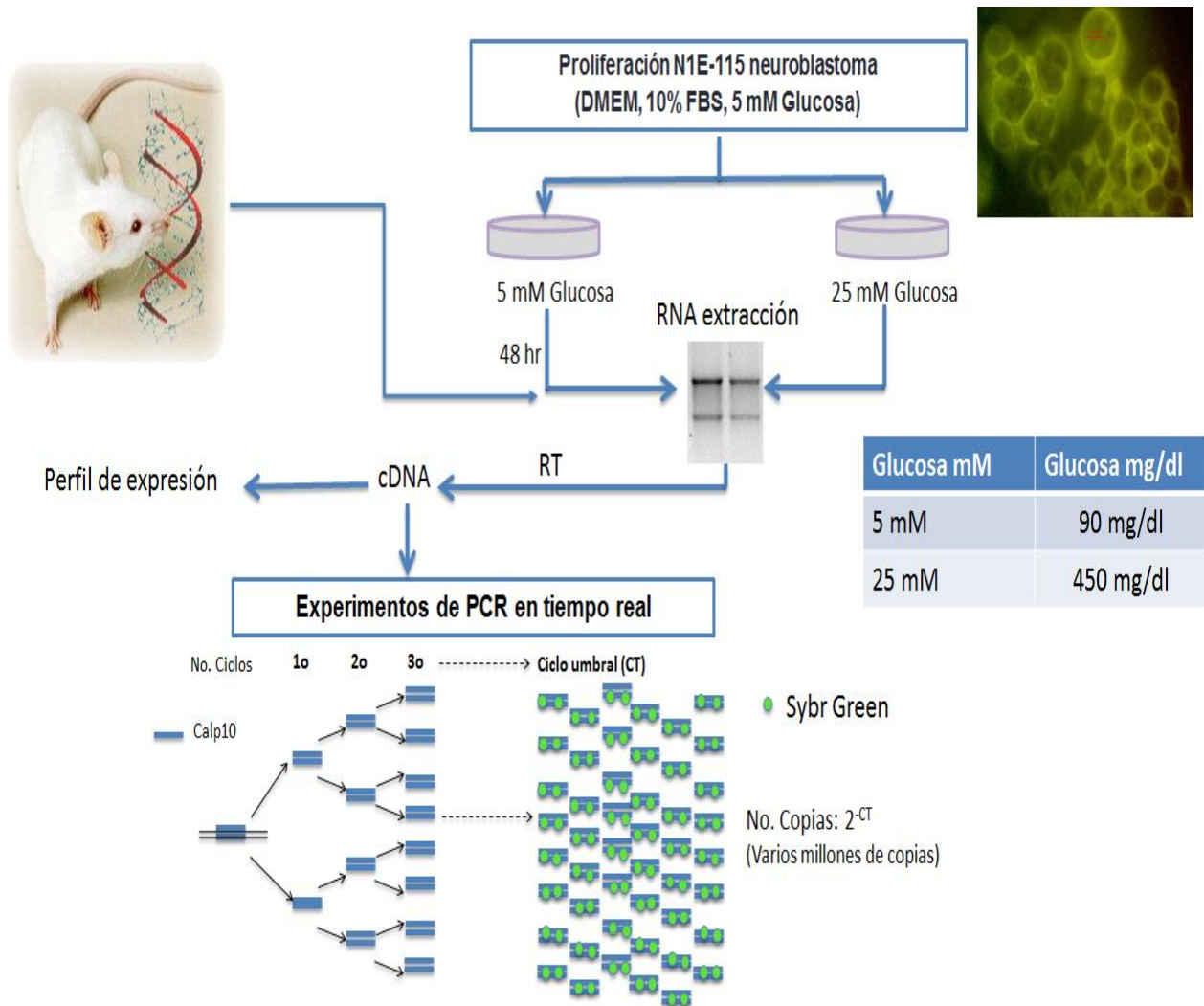
DORNA= 40

INTEGRIDAD DEL RNA

- Tomar un volumen equivalente a 2µg de RNA y llevarlo a 10µl con DEPC
- Calentar la muestra 5 min a 65°C
- Centrifugar rápidamente
- Agregar 1 µl de buffer de carga
- Correr un gel de acrilamida al 1.5% teñido con Bromuro de etidio 0.5mg/µl

ANEXO 3

Fundamento de PCR en Tiempo Real.



Como se sabe la reacción en cadena de la polimerasa depende de la unión de dos *primers* cuyas secuencias son complementarias a los extremos 3' del segmento del cDNA (o DNA) que se desea amplificar. Estos oligonucleótidos se orientan de tal manera que su extensión por una polimerasa de DNA resulta en la duplicación del segmento comprendido entre dichos *primers*, cada vez que se completa un ciclo, la cantidad de cDNA sintetizada en el ciclo anterior es duplicada. Esto da

como resultado una acumulación exponencial de las copias de cDNA que puede describirse mediante la siguiente ecuación

$$N = N_0 2^{Cx}$$

N_0 = Número de copias al inicio de la reacción

N = Número de copias que hay después de x ciclos de amplificación

Cx = Número de ciclos

Las copias iniciales (N_0) son generadas durante la etapa de transcripción inversa y reflejan la abundancia del mRNA respectivo en la muestra de RNA total. (Saiki *et al.*, 1988).

Suponiendo que el proceso ocurre con una eficiencia máxima, es decir, que el número de copias inicial se duplica al doble de cada ciclo, entonces, de una copia obtendremos dos copias. En tales condiciones, cuando $N_0=2$, la cantidad de cDNA a cualquier número de ciclos es siempre el doble en comparación a $N_0=1$, esto quiere decir, que si la amplificación se desarrolla exponencialmente, entonces la cantidad de cDNA final de cada ciclo de PCR es directamente proporcional a N_0 y, por consiguiente, al número de moléculas de mRNA presentes en la muestra. En la práctica la eficiencia no es 2 por ello se calculó la eficiencia de amplificación para cada par de primers.

Así es que, si se desea utilizar la cantidad de cDNA como índice de los niveles del mRNA correspondiente, es necesario evaluar esa cantidad en la fase exponencial de la PCR. Esto se puede realizar en el llamado ciclo umbral (CT).

Como elegimos un valor ideal de fluorescencia (0.5) para determinar el ciclo umbral, cuando se alcanza este valor y se desea comparar la abundancia relativa de un mismo cDNA se tiene que aplicar esta fórmula:

$$N_{CTB} = N_{CTA}$$

Es decir que:

$$\frac{N_{CTA}}{N_{CTB}} = 1$$

$$1 = \frac{N_{0A}(1 + eff)^{CT_A}}{N_{0B}(1 + eff)^{CT_B}}$$

Por lo tanto:

$$N_{0A}/N_{0B} = \frac{(1 + eff)^{CT_B}}{(1 + eff)^{CT_A}}$$

Es decir:

$$N_{0A}/N_{0B} = (1 + eff)^{CT_B - CT_A}$$

$$N_{0A}/N_{0B} = (1 + eff)^{-(CT_A - CT_B)}$$

$$N_{0A}/N_{0B} = (1 + eff)^{-\Delta CT}$$

Donde:

N_{0A} = Número de copias inicial de cDNA en las células N1E-115 expuestas a 25mM de glucosa.

N_{0B} = Número de copias inicial de cDNA en la situación control.

$1+eff$ = Eficacia calculada de la amplificación.

CT = Ciclo en el cual se alcanza el umbral de amplificación.

ΔCT = Diferencia en el valor del ciclo umbral observado entre las dos condiciones.

Si el ΔCT tiene un valor de 0 esto significa que la entrada del mRNA de las dos condiciones es igual. Si el ΔCT es negativo, la entrada de mRNA del control es mayor a la entrada del mRNA de la condición experimental y viceversa.

Para la PCR en tiempo real a cada par de copias se adhiere un marcador fluorescente en este caso Sybr Green, el cual, fluoresce cada vez que se separan los complementos y esta señal es la que capta el termociclador. Y como se acaba de mencionar, entre mayor sea el número inicial de copias de cDNA, más rápido se alcanza el CT y viceversa, un CT bajo significa que el mensajero del RNA que nos interesa es muy abundante y se detectará con mayor rapidez en la PCR en tiempo real.