



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE MEDICINA

*“El Efecto de la Glucosa en la Actividad  
de las Calpaínas en Células Linfoides”*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA  
BÁSICA

P R E S E N T A :

LUCÍA YÁÑEZ TIRADO

Directora de tesis:

DRA. ANA MARÍA SALAZAR MARTÍNEZ

MÉXICO D.F., 2015.

FACULTAD DE MEDICINA





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **PRESENTACIÓN**

La Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México promueve la formación de jóvenes investigadores enfocados en el área de ciencias de la Salud mediante la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica; misma que se desarrolla en vinculación con el Instituto de Investigaciones Biomédicas y el Instituto de Fisiología Celular de la propia universidad.

El objetivo principal de esta licenciatura, además de la formación, incluye la integración de los estudiantes a la investigación de los grandes problemas de salud pública, como es el caso de la diabetes en nuestro país.

Esta tesis forma parte de una línea de investigación realizada en el laboratorio del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental.

Agradezco el apoyo técnico de:

**Q.F.B. Lourdes Monserrat Sordo Cedeño**

La genotipificación de los donadores de este estudio se realizó con la asesoría de:

**Dra. Patricia Mendoza Lorenzo**

Este trabajo recibió financiamiento de **PAPIIT-IN201914**.

Agradezco el esfuerzo del personal de la **Biblioteca del Instituto de Investigaciones Biomédicas**, especialmente de la **Lic. Lucía Brito Ocampo**, Coordinadora de la Biblioteca y de **María Petra Muñoz García**. Así mismo, reconozco el apoyo brindado por la **Lic. Martha Cariño Aguilar**, el **Lic. Erasto Brito Brito** y **Laura Velázquez Contreras**.

**GRACIAS**

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>RESUMEN</b> .....	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>8</b>
<b>2.1</b>	<b>DIABETES</b> .....	<b>8</b>
2.1.1	CARACTERÍSTICAS DE LA ENFERMEDAD.....	8
2.1.2	DIABETES MELLITUS TIPO 1.....	9
2.1.3	DIABETES MELLITUS TIPO 2.....	10
2.1.4	DIABETES GESTACIONAL.....	10
2.1.5	OTROS TIPOS ESPECÍFICOS DE DIABETES.....	11
2.1.6	DIAGNÓSTICO.....	12
<b>2.2</b>	<b>GLUCOSA</b> .....	<b>13</b>
2.2.1	DIGESTIÓN.....	13
2.2.2	ABSORCIÓN.....	13
<b>2.3</b>	<b>PÁNCREAS</b> .....	<b>15</b>
2.3.1	PÁNCREAS EXOCRINO.....	15
2.3.2	PÁNCREAS ENDOCRINO.....	15
<b>2.4</b>	<b>INSULINA</b> .....	<b>18</b>
2.4.1	MECANISMO DE SECRECIÓN.....	19
2.4.2	EFFECTOS.....	20
<b>2.5</b>	<b>LA FAMILIA DE LAS CALPAÍNAS</b> .....	<b>22</b>
<b>2.6</b>	<b>CALPAÍNA-10 Y DIABETES MELLITUS TIPO 2</b> .....	<b>24</b>
<b>2.7</b>	<b>LINFOCITO COMO MODELO DE ESTUDIO</b> .....	<b>26</b>
<b>3</b>	<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>28</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>28</b>
<b>4.1</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>28</b>
<b>5</b>	<b>DISEÑO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>29</b>
<b>5.1</b>	<b>MATERIALES Y EQUIPO</b> .....	<b>29</b>
<b>5.2</b>	<b>SOLUCIONES</b> .....	<b>29</b>
5.2.1	KRB.....	29

5.2.2	KRH.....	29
5.2.3	SUSTRATO PARA MEDIR LA ACTIVIDAD DE CALPAÍNAS.....	29
5.2.4	GLUCOSA.....	29
<b>5.3</b>	<b>MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
5.3.1	CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES.....	30
5.3.2	OBTENCIÓN DE LINFOCITOS HUMANOS.....	30
5.3.3	ACTIVIDAD DE CALPAÍNAS.....	31
5.3.4	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA EN SANGRE.....	32
<b>5.4</b>	<b>DETERMINACIÓN DE POLIMORFISMOS EN EL GEN CAPN10 (InDel-19).....</b>	<b>32</b>
<b>5.5</b>	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>	<b>33</b>
<b>6</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
<b>7</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>40</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>44</b>
<b>9</b>	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>45</b>

## 1 RESUMEN

La diabetes es un problema de salud pública para nuestro país. La diabetes mellitus tipo 2 es un desorden metabólico complejo que se caracteriza por la presencia de niveles altos de glucosa en sangre debido a defectos en la acción de la insulina en tejidos periféricos y/o defectos en la secreción de insulina por las células *beta* del páncreas. Factores de riesgo genéticos y ambientales que interactúan entre sí para dar lugar al desarrollo de dicha patología; entre los factores genéticos se ha encontrado que existen variantes heredables conocidas como polimorfismos que pueden incrementar el riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2. Particularmente, polimorfismos en el gen de la calpaína-10 (CAPN10) han sido asociados con la incidencia esta enfermedad en población mexico-americana, mostrando que el haplotipo de riesgo conformado por el SNP 43, InDel-19 y SNP 63 confieren susceptibilidad a desarrollar la enfermedad.

La calpaína-10 es una proteasa de cisteína que juega un papel importante en la regulación de la secreción de insulina mediada por glucosa y que participa en la captura de glucosa estimulada por insulina en células periféricas. El linfocito humano representa un buen modelo de estudio puesto que no se requieren métodos invasivos para su obtención y de acuerdo a estudios realizados previamente en el laboratorio los linfocitos humanos expresan la proteína de calpaína-10.

El objetivo de este trabajo fue evaluar si la activación de las calpaínas por altas concentraciones de glucosa extracelular es dependiente del polimorfismo InDel-19. Para ello se caracterizaron los cambios producidos en estas células al incubarlas a diferentes concentraciones extracelulares de glucosa. Los datos mostraron que la actividad de las calpaínas aumentó significativamente al exponer las células a altas concentraciones de glucosa extracelular (200 y 280 mg/dL). Además, se evaluó si existen alteraciones en la actividad enzimática de las calpaínas en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 en comparación con individuos sanos. Los resultados muestran que la actividad en individuos con la enfermedad es

menor y que disminuye la sensibilidad a los cambios de concentración extracelular de glucosa. También se analizó la posibilidad de que cambios genéticos en CAPN10, específicamente la inserción/delección en la posición 19 del gen, afecta directamente a la actividad de las calpaínas en individuos sanos. Los resultados mostraron que la actividad tiende a disminuir en los donadores con el genotipo heterocigoto 32 en comparación con donadores homocigotos 33.

En este trabajo se logró demostrar que las calpaínas participan en la respuesta de las células linfoides como consecuencia de cambios en la concentración de glucosa, indicando que estas células son un modelo celular potencial para el estudio de la homeostasis de la glucosa.



## 2 INTRODUCCIÓN

### 2.1 DIABETES

La diabetes representa un gran problema de salud en la población mexicana y resulta alarmante que el número de casos en personas más jóvenes vaya en aumento.

De acuerdo a la *American Diabetes Association* (ADA), la prevalencia de la diabetes continúa incrementándose en todo el mundo. En México, la Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas [ENEC 1993] estimó una prevalencia de 8.2% en la población de 20 a 69 años; siete años más tarde, la Encuesta Nacional de Salud 2000 [ENSA 2000] estimó la prevalencia en 10.9% [1].

La mortalidad por diabetes se ha incrementado también durante los últimos años. La OMS prevé que las muertes por diabetes se multipliquen al doble entre 2005 y 2030 [2].

#### 2.1.1 CARACTERÍSTICAS DE LA ENFERMEDAD

La diabetes es una patología metabólica compleja debido a que existen factores de riesgo genéticos y ambientales que interactúan entre sí y que confieren susceptibilidad a desarrollar la enfermedad [3, 4]. La principal característica de dicha patología es la hiperglucemia crónica en sangre debido a defectos en la secreción de la insulina por las células  $\beta$  del páncreas y su efecto ineficiente en tejidos periféricos [5]. Además, la diabetes aumenta el riesgo de padecer otras enfermedades como son:

- Cardiopatías.
- Neuropatías de los pies combinadas con reducción del flujo sanguíneo (por lo tanto úlceras y amputación de miembros inferiores).
- Retinopatías - siendo la causa más importante de ceguera a consecuencia del daño de los vasos sanguíneos de la retina.
- Insuficiencia renal - del 10 a 20% de los pacientes con diabetes mueren por esta causa.

- De manera general, el riesgo de muerte en personas con diabetes es el doble en comparación a aquellos individuos que no presentan la enfermedad [1].

De acuerdo a la Federación Internacional de Diabetes (*International Diabetes Federation*) la enfermedad puede clasificarse en las siguientes categorías [6]:

- Diabetes Mellitus Tipo 1 (DM1)
- Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2)
- Diabetes gestacional
- Otros - a su vez se subdividen en 8 categorías:
  - a) Defectos Monogénéticos que afectan a la función de la célula  $\beta$
  - b) Defectos genéticos que afectan la acción de la insulina
  - c) Enfermedades del páncreas exocrino
  - d) Endocrinopatías
  - e) Diabetes inducida por fármacos
  - f) Diabetes generada por infecciones
  - g) Diabetes mediada por el sistema inmune
  - h) Síndromes genéticos asociados con diabetes.

Los síntomas principales de la diabetes mellitus son: aumento en la ingesta de alimento (polifagia), incremento en la sed (polidipsia) y emisión excesiva de orina (poliuria)[1,5].

### **2.1.2 DIABETES MELLITUS TIPO 1**

La DM1 se conoce también con los nombres de Diabetes Insulino-Dependiente, comienzo juvenil o autoinmune. Se presenta mayoritariamente en jóvenes y resulta de la destrucción autoinmune de las células  $\beta$  pancreáticas.

El daño causado a las células  $\beta$  por el sistema inmune tiene diversas causas genéticas y está asociado principalmente con polimorfismos del gen del antígeno leucocitario humano (HLA por sus siglas en inglés). Los individuos con DM1 pueden presentar anticuerpos contra la

insulina, ácido glutámico descarboxilasa (GAD por sus siglas en inglés), islotes y/o fosfatasa de tirosina. [7].

Esta forma de diabetes es hereditaria y la cetoacidosis (acidificación de la sangre debido a la formación de cuerpos cetónicos por el uso de ácidos grasos como fuente de energía) suele ser una de las principales manifestaciones clínicas.

### **2.1.3 DIABETES MELLITUS TIPO 2**

En la población este tipo de diabetes es la más común de todas. Se presenta en un 90 a 95% de personas diabéticas y su principal característica es la resistencia a la insulina [2]. Existen muchas causas de esta enfermedad. Entre los factores más asociados se encuentran la obesidad y el sobrepeso.

En la diabetes mellitus tipo 2 el aumento en los niveles de glucosa en sangre es crónico [6]. Es probable que un individuo con esta patología no presente síntomas hasta que la enfermedad se encuentre en estados avanzados.

En pacientes con diabetes mellitus tipo 2 los niveles de insulina generalmente se encuentran en intervalos normales o incluso elevados, sin embargo, se sugiere que los mecanismos de secreción de la misma son deficientes, ya que no se logra compensar la resistencia a la hormona y por consecuencia, bajar los niveles de glucosa a rangos normales ( $\leq 100$  mg/dL en condiciones de ayuno) [5]. Se ha observado que los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 presentan niveles elevados de glucagón, característica que agrava aún más la enfermedad [7, 8].

### **2.1.4 DIABETES GESTACIONAL**

La diabetes gestacional se presenta en una de cada 25 mujeres embarazadas. Esta enfermedad se caracteriza por los altos niveles de glucosa durante el embarazo (detectados por primera vez durante este periodo). Este tipo de diabetes generalmente se manifiesta en el primer trimestre de gestación y desaparece después del embarazo, sin embargo incrementa el riesgo a desarrollar diabetes mellitus tipo 2. Aproximadamente el 50% de mujeres que padecen

diabetes gestacional desarrollan diabetes mellitus tipo 2 en los siguientes 5 a 10 años después de haber dado a luz [5,6].

### 2.1.5 OTROS TIPOS ESPECÍFICOS DE DIABETES

Este grupo de diabetes se subdivide en distintos subgrupos:

- Diabetes por defectos monogenéticos en la función de la célula  $\beta$  pancreática:  
Se caracteriza por la manifestación de hiperglucemia a edad temprana debido a alteraciones en la secreción de insulina. La forma más común está asociada con mutaciones en el cromosoma 12 en un factor de transcripción conocido como factor nuclear de hepatocito (HNF)-1alfa.  
Formas menos comunes resultan de mutaciones en:
  - El gen de la glucocinasa
  - Otros factores de transcripción
  - DNA mitocondrial (del tipo puntual) [9].
- Diabetes por defectos genéticos en la acción de la insulina:  
Se caracteriza por la presencia de mutaciones en el receptor de la insulina [10].
- Enfermedades del páncreas exocrino:  
Dentro de este grupo de enfermedades se encuentran aquellas en las que existen lesiones o alteraciones que afectan la función del páncreas, ocasionando su desarrollo. Entre estas patologías se enlistan:
  - Pancreatitis
  - Pancreatectomía
  - Carcinoma pancreático.
- Diabetes ocasionada por endocrinopatías
- Diabetes ocasionada por sustancias químicas o fármacos
- Diabetes ocasionada por infecciones
- Diabetes mediada por el sistema inmune  
Dentro de este grupo destaca el Síndrome Stiffman, desorden autoinmune del sistema nervioso central caracterizado por la presencia de anticuerpos anti-receptor de insulina.
- Otros síndromes genéticos asociados a diabetes
  - Síndrome de Down
  - Síndrome Klinefelter
  - Síndrome de Turner [11].

## 2.1.6 DIAGNÓSTICO

La *American Diabetes Association* (ADA) sugiere que para diagnosticar adecuadamente la Diabetes Mellitus Tipo 2 se deben realizar las siguientes pruebas:

- A. Determinación de hemoglobina glicada HbA<sub>1c</sub> (A1C) – esta prueba calcula el promedio de la glucosa en sangre en los últimos 2 a 3 meses. La ventaja de esta prueba es que el paciente no debe encontrarse en ayuno.
- B. Determinación de las concentraciones de glucosa plasmática en ayuno (8-12horas).
- C. Prueba o Curva de tolerancia oral a la glucosa – esta evaluación permite valorar los niveles de glucosa en sangre antes y después (2 horas) de haber ingerido 75 g de glucosa disuelta en agua, los datos permiten determinar la manera en que el organismo procesa la glucosa.

**Tabla 1.** Intervalos sugeridos por la ADA para el diagnóstico de la diabetes mellitus tipo 2.

DIAGNÓSTICO	A	B	C
NORMAL	<5.7%	<100mg/dL	<140mg/dL
PRE-DIABETES	≥ 5.7% - < 6.4%	≥ 100mg/dL - <126mg/dL	≥ 140mg/dL - <200mg/dL
DIABETES	≥ 6.5%	≥ 126mg/dL	≥ 200mg/dL

- A. Hemoglobina glicada HbA<sub>1c</sub> (A1C).
- B. Determinación de las concentraciones de glucosa plasmática en ayuno (8-12horas).
- C. Prueba o Curva de tolerancia oral a la glucosa.

El término pre-diabetes se utiliza para referirse al estado en el cual los pacientes presentan un intervalo de concentraciones de glucosa en la sangre mayor a lo considerado como normal, sin embargo, estas concentraciones de glucosa aún no son determinantes para desarrollar la enfermedad [5, 12].

La diabetes es una enfermedad multifactorial compleja, por lo que se requiere de la interacción entre diversos genes con factores ambientales para su desarrollo. Diversos estudios genéticos han logrado identificar alrededor de 50 genes que participan en diversas vías bioquímicas, regulatorias y de transducción involucrados en la diabetes mellitus tipo 2 [13, 14, 15].

## **2.2 GLUCOSA**

La glucosa es el carbohidrato más importante en los mamíferos debido a que es la principal fuente de energía para el metabolismo celular, incluso existen tejidos para los cuales es la principal (por ejemplo en eritrocitos). La glucosa tiene además diversas funciones en el organismo, tales como: la producción de la ribosa para la formación de ácidos nucleicos, glicosilación de lípidos y proteínas; reconocimiento e inmunidad, entre otras.

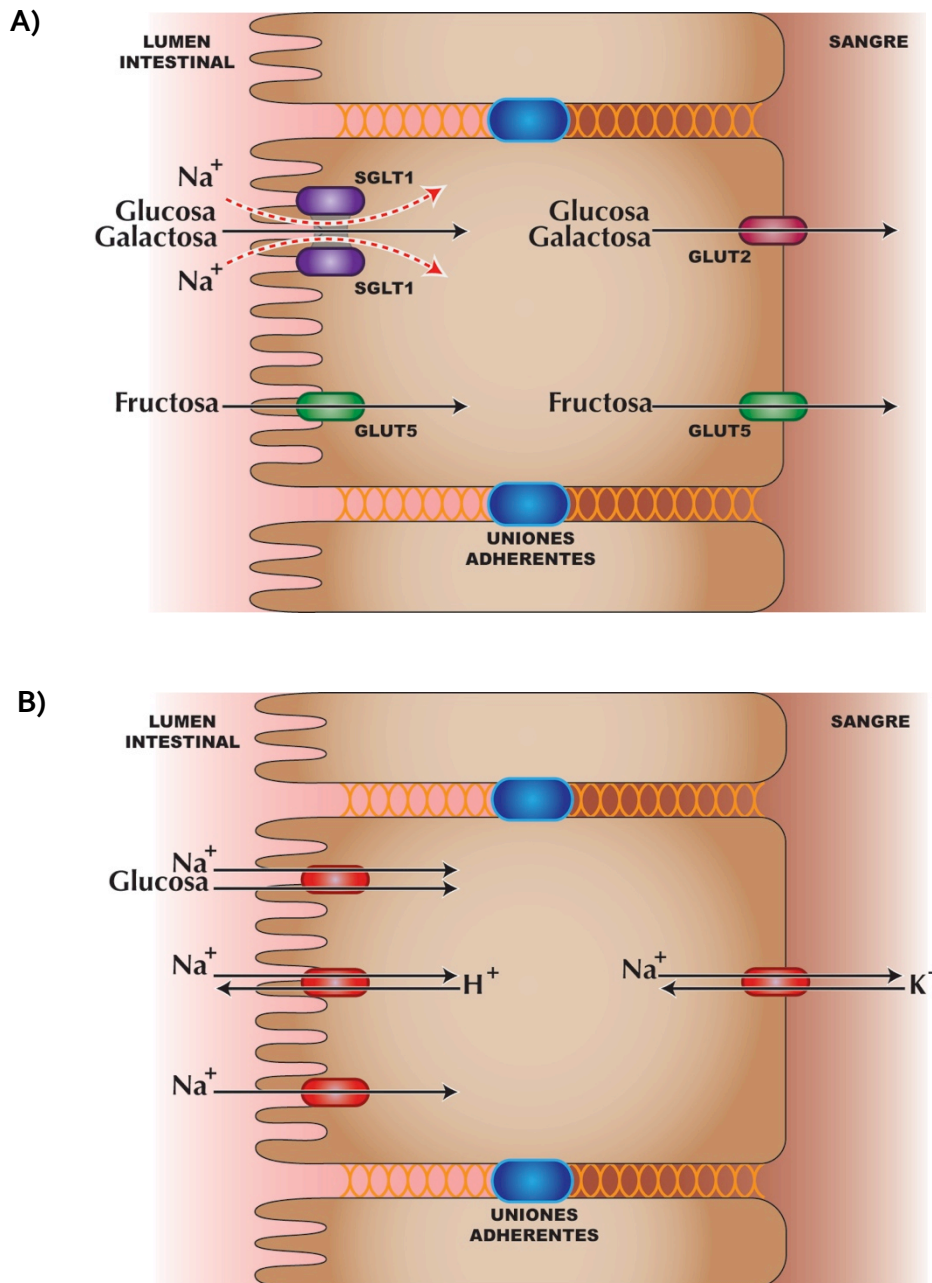
El 95% de los carbohidratos consumidos en la dieta en forma de amilosa, amilopectina, sacarosa, lactosa y fructosa son transformados en glucosa por el hígado para su posterior almacenamiento o utilización [16].

### **2.2.1 DIGESTIÓN**

Los carbohidratos consumidos en la dieta son inicialmente degradados por la enzima salival ptialina ( $\alpha$ -amilasa) secretada por la glándula parótida. Esta enzima hidroliza el almidón en dextrina, maltosa y maltotriosa. Posteriormente, al deglutir los alimentos, la ptialina es inactivada en el estómago debido al pH ácido del jugo gástrico, de modo que la amilasa pancreática continúa con la degradación del resto de los almidones en polímeros de glucosa y maltosa. En el intestino, células del epitelio (enterocitos) llevan a cabo la etapa final de la degradación de los carbohidratos, a partir de la acción de enzimas como lactasa, maltasa, sacarasa, y  $\alpha$ -dextrinasa o isomaltasa [17].

### **2.2.2 ABSORCIÓN**

Los monosacáridos producto de la digestión anteriormente descrita son absorbidos y transportados a la sangre mayoritariamente por el duodeno y el yeyuno proximal. La glucosa y la galactosa son absorbidas por un mecanismo de co-transporte acoplado a sodio, este mecanismo es denominado SGLT1. Por otro lado la fructosa tiene un transportador específico denominado GLUT 5. Una vez dentro de las células epiteliales los monosacáridos ingresan a los capilares sanguíneos a través del transportador GLUT 2, ubicado en la membrana plasmática basal. Este mecanismo de transporte está facilitado por el intercambio de iones sodio y potasio. Una vez que los monosacáridos son absorbidos, éstos son drenados y transportados a través de la vena porta al hígado, donde rápidamente la fructosa y la galactosa son convertidas en glucosa (Fig. 1).



**Figura 1. A)** La glucosa y galactosa compiten entre sí por un mecanismo de co-transporte acompañados con  $\text{Na}^+$ , denominado SGLT1, mientras que la fructosa tiene un transportador específico GLUT 5, que es un miembro de la familia de transportadores GLUT. Una vez dentro de las células estos tres monosacáridos son trasladados a los capilares sanguíneos por un transportador común el GLUT 2, ubicado en la membrana plasmática basal. **B)** Este mecanismo de transporte está facilitado por el intercambio de iones sodio y potasio [18].

## 2.3 PÁNCREAS

El páncreas es una glándula de secreción endocrina y exocrina, ya que vierte su contenido a la sangre (secreción interna) y al tubo digestivo (secreción externa).

### 2.3.1 PÁNCREAS EXOCRINO

Morfológicamente la glándula pancreática exocrina presenta un aspecto ramificado que permite su división en lóbulos visibles formados de ácinos secretores. Cada lóbulo está constituido por un conjunto de entre 15 y 100 células acinares sintetizadoras y secretoras de aproximadamente 20 zimógenos y enzimas digestivas. La secreción de estos lóbulos es drenada por conductos que desembocan al ducto principal o de Wirsung. El conducto de Wirsung se origina en la cola del páncreas, recorre el cuerpo y recibe el jugo pancreático para conducirlo al duodeno. En la unión del conducto principal y el duodeno se encuentra el esfínter de Oddi, que controla el paso de los jugos pancreáticos y la bilis hacia el duodeno.

El conducto de Santorini o ducto accesorio únicamente recoge el jugo pancreático secretado por las células de la parte superior de la cabeza del páncreas. Éste ducto forma la papila accesoria ya que alcanza al tejido duodenal por encima del conducto de Wirsung.

La función del jugo pancreático es colaborar con la digestión de grasas, proteínas, carbohidratos y promueve que el quimo (ácido procedente del estómago) se neutralice, ya que el pH del jugo pancreático oscila entre 8.1 y 8.5 [17].

### 2.3.2 PÁNCREAS ENDOCRINO

El páncreas endocrino está formado por acumulaciones de células dispuestas desordenadamente en su cabeza, cuerpo y cola, conocidos como islotos de Langerhans o pancreáticos. Los islotos pueden ser ovalados o esféricos y tienen un diámetro de 50 a 300  $\mu\text{m}$ ; en algunos lugares, están unidos a células glandulares exocrinas. Se pueden contabilizar entre 500,000 y 1 millón de islotos en condiciones normales. Estos islotos son denominados porción endocrina debido a que tienen la capacidad de introducir directamente en la sangre su



secreción (hormonas <sup>1</sup>) [19]. Dicha característica se debe a que los islotes están abundantemente irrigados por un sistema de vasos sanguíneos. La sangre que sale de los islotes se mezcla con la intestinal a través de la vena porta.

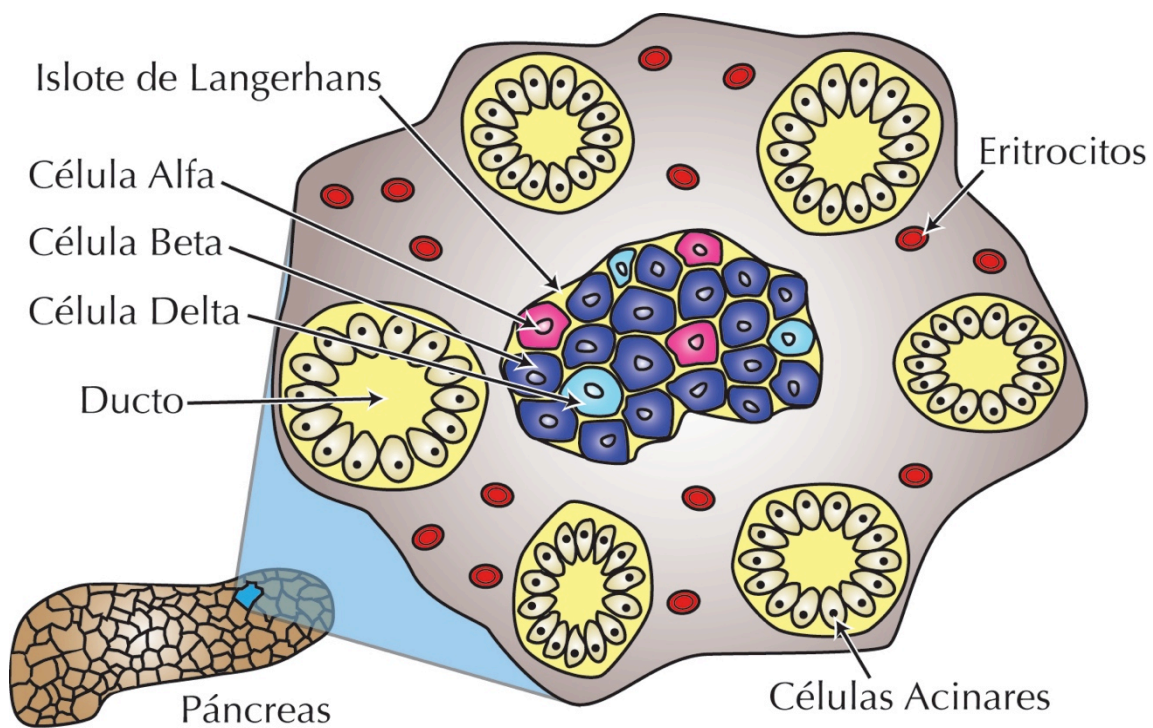
En los islotes distinguimos distintos tipos de células que llevan a cabo diferentes funciones (Figura 2), entre las cuales se encuentran:

- **Células Alfa:** Estas células representan el 20% del total de las células en los islotes y, en los roedores predominan en su periferia; en humanos, las células alfa se encuentran cerca de vasos vasculares al interior del islote, generalmente se encuentran rodeadas por células beta. Las células alfa son las encargadas de secretar glucagon, hormona responsable del aumento de la glucemia. La secreción de esta hormona es estimulada por la ingesta de proteínas, el ejercicio y la hipoglucemia, mientras que la ingesta de hidratos de carbono, la somatostatina y la hiperglucemia la inhiben. El glucagon aumenta la glucemia porque estimula la formación de glucosa en el hígado a partir del glucógeno hepático. Por esta razón decimos que el glucagon es una hormona antagónica a la insulina.
- **Células Beta:** Estas células representan el 80% de las células totales en los islotes y, en los roedores, predominan en la zona central; en humanos, la distribución es diferente ya que abarca todo el islote de manera aleatoria, generalmente rodeando a las células alfa. Las células  $\beta$  secretan principalmente insulina, péptido C y amilina; son capaces de percibir ligeros cambios en la concentración de la glucosa sanguínea. La insulina es una hormona que promueve la entrada de glucosa de la sangre al interior de la célula, además estimula la síntesis de glucógeno, lípidos y proteínas así como la inhibición de la gluconeogénesis, la lipólisis y la degradación de proteínas y glucógeno [20, 21].
- **Células Delta:** Estas células, que aparecen en menor proporción secretan principalmente somatostatina [17].

---

<sup>1</sup> Las hormonas son sustancias químicas producidas por las glándulas endocrinas que actúan como mensajeros químicos en concentraciones plasmáticas muy reducidas y lejos del punto de secreción. La acción de las hormonas sobre los distintos tejidos depende de su naturaleza química y de la capacidad de fijación de las células receptoras de los órganos. Las hormonas pueden ser de naturaleza lipídica, peptídica o mixta. La insulina y el glucagón son de naturaleza peptídica [20].

- Células acinares: estas células sintetizan y secretan proteínas hacia el lumen de la estructura epitelial. Las células acinares secretan aproximadamente 20 zimógenos y enzimas digestivas. De acuerdo a la función que desarrollan estas enzimas se clasifican en 4 grupos: proteolíticas, lipolíticas, glucolíticas y nucleolíticas.

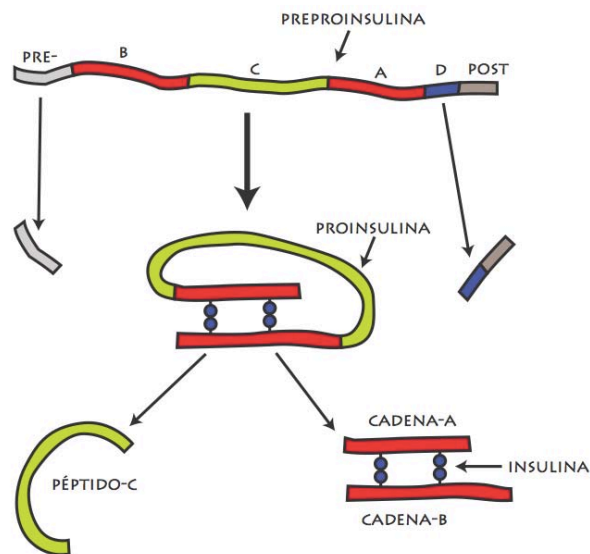


**Figura 2.** El islote pancreático humano.

## 2.4 INSULINA

La insulina es una hormona sintetizada por las células  $\beta$  pancreáticas. En humanos, esta hormona está codificada por un solo gen (INS) localizado en el brazo corto del cromosoma 11 (11p15.5) [19].

La transcripción del gen es estimulada cuando las células  $\beta$  reconocen aumentos mínimos en la concentración de glucosa en sangre. El péptido que se sintetiza en primera instancia es la pre-proinsulina que contiene una *secuencia señal* (de aproximadamente 24 aminoácidos) seguida de los dominios B, C y A del péptido. Al ingresar al retículo endoplásmico la secuencia señal se separa del resto del péptido (dominios B, C y A) dando lugar a la proinsulina. Esta molécula es proteolizada en el trans-Golgi por endoproteasas que liberan el péptido C del resto de la cadena polipeptídica. Las cadenas A y B permanecen unidas por puentes disulfuro conformando así la molécula madura de la insulina (Figura 3) [19].



**Figura 3.** Síntesis de la Insulina

La insulina asociada a zinc y el péptido C son empacados en gránulos secretores para su liberación al torrente sanguíneo.

La célula  $\beta$  almacena aproximadamente 10,000 gránulos, los cuales son liberados a través del proceso celular conocido como exocitosis al presentarse un estímulo de glucosa en sangre [22].

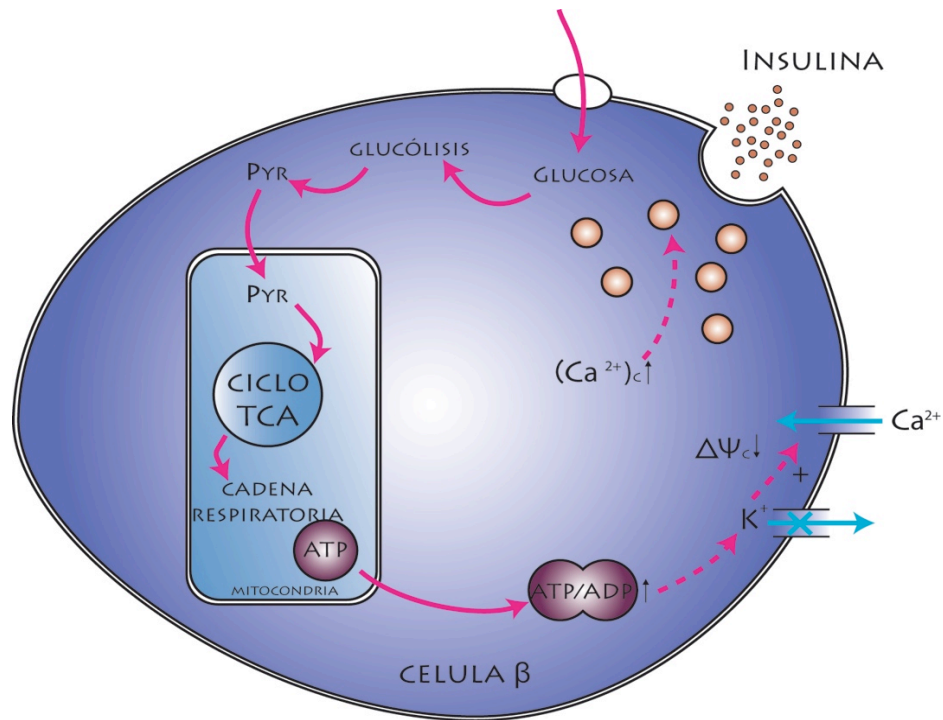
La secreción de insulina se lleva a cabo en un proceso bifásico:

La primera fase consiste en la respuesta rápida de las células  $\beta$  para contrarrestar los niveles altos de glucosa y se caracteriza por liberación rápida y transitoria de gránulos de insulina que decae con estimulaciones repetidas. Si los niveles de glucosa en sangre se mantienen altos comienza un incremento gradual de secreción de gránulos (segunda fase) [23, 24].

#### **2.4.1 MECANISMO DE SECRECIÓN**

La glucosa ingresa a la célula pancreática a través del transportador de glucosa GLUT 2. Dentro de la célula, la glucosa es metabolizada a través de la glucólisis, el ciclo de los ácidos tricarbónicos y la fosforilación oxidativa. Estos procesos generan adenosín trifosfato (ATP). Al metabolizarse, el aumento celular de ATP/ADP genera el cierre de los canales de potasio membranales sensibles a ATP. El cierre de estos canales produce una depolarización de la membrana celular hasta alcanzar el nivel de voltaje en el cual se abren los canales de sodio y calcio (Figura 4) [22, 24-28].

La exocitosis de la insulina está controlada por la concentración de calcio intracelular y mediada por la activación de la cascada de fosforilación de calcio calmodulina y las interacciones en las que participan las proteínas SNAREs (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive Fusion Protein Attachment Protein Receptors) que se localizan en la superficie de vesículas (v-SNARE) y en la membrana plasmática (t-SNARE) [22, 26].

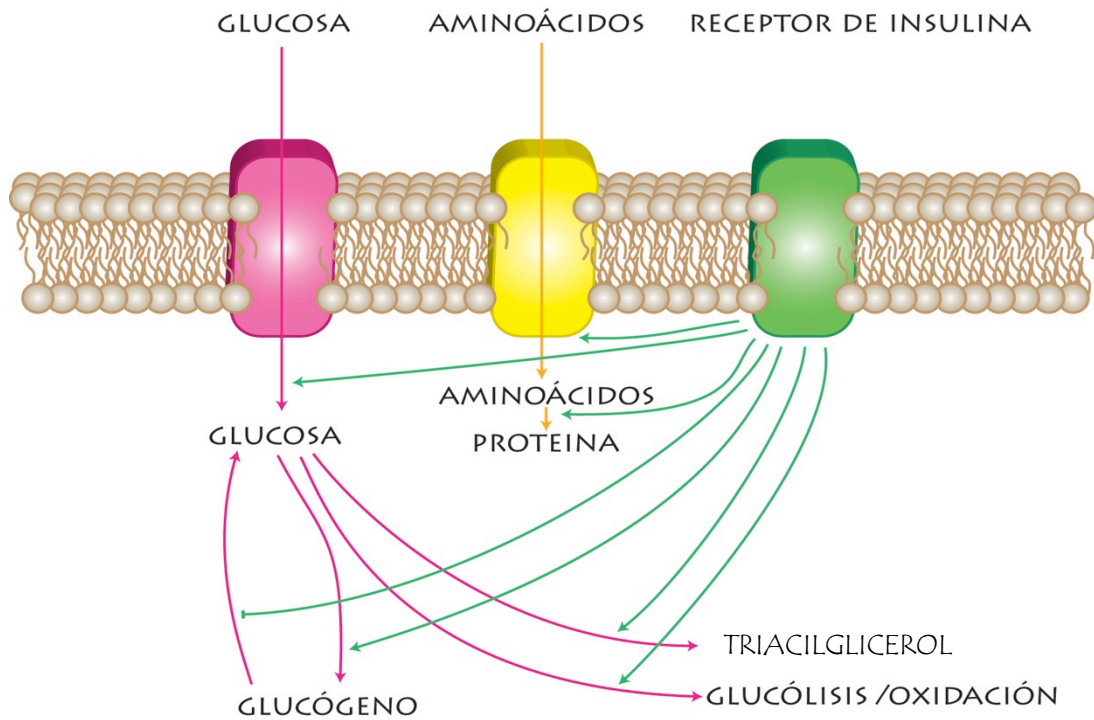


**Figura 4.** Mecanismo de la secreción de la insulina por las células  $\beta$  pancreáticas.

## 2.4.2 EFECTOS

Una vez liberada a la circulación, la insulina entra directamente al hígado a través de la vena porta activando el receptor de insulina<sup>2</sup> que conlleva a eventos específicos de fosforilación [19]. En músculo y tejido adiposo se observa un aumento en el almacenamiento de glucosa, principalmente debido a que la insulina tiene un efecto en la concentración del transportador de glucosa en la membrana. La insulina también promueve la disminución concomitante en la secreción de glucosa del hígado a la circulación. Otros efectos de la insulina en tejidos periféricos es el aumento en la entrada de ácidos grasos y aminoácidos en células blanco, promueve la síntesis de proteínas y lípidos e inhibe la degradación de dichas biomoléculas (Figura 5) [21].

<sup>2</sup> El receptor de la insulina pertenece a la clase de receptores de la superficie celular que tienen una actividad de tirosina cinasa intrínseca. El receptor de la insulina es un heterotetrámero de 2 sub-unidades extracelulares  $\alpha$  unidas por puentes disulfuro a 2 sub-unidades transmembrana  $\beta$ .

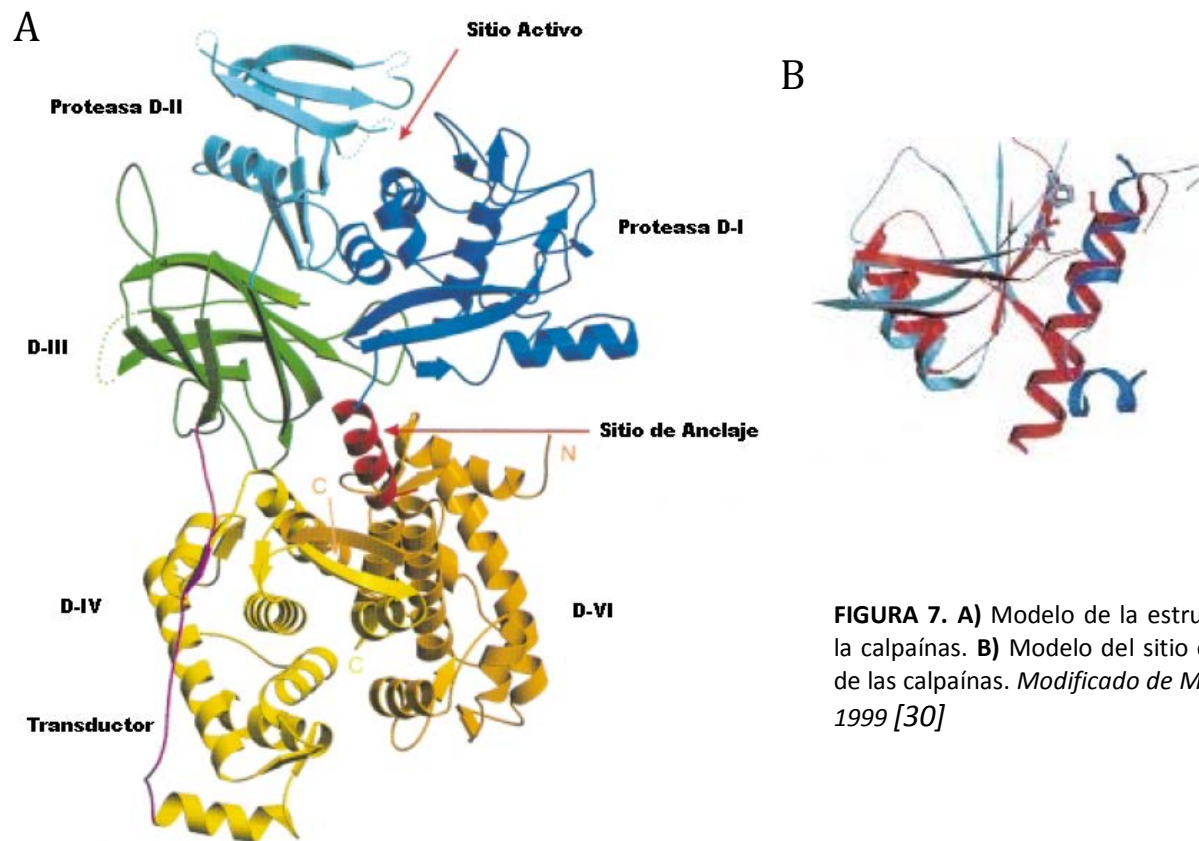


**Figura 5.** La Insulina estimula la toma de glucosa, aminoácidos y ácidos grasos por parte de la célula. También incrementa la expresión y la actividad de enzimas que sintetizan glucógeno mientras que inhibe la actividad o la expresión de aquellas que catalizan la degradación.

La insulina reduce la secreción de la hormona glucagon y glucagón sus efectos. El glucagon aumenta la síntesis de glucosa y su movilización en el tejido hepático. Su secreción también es mediada por los niveles de glucosa en sangre [22].

## 2.5 LA FAMILIA DE LAS CALPAÍNAS

Las calpaínas son proteasas de cisteína tipo no lisosomal descritas por primera vez en 1964. Estas enzimas se encontraron en el cerebro y el cristalino. Una de las características principales que las distinguen es que su activación es dependiente de calcio. Su nombre proviene de la contracción de las palabras calcio y papaína [29].



**FIGURA 7. A)** Modelo de la estructura de la calpaínas. **B)** Modelo del sitio catalítico de las calpaínas. Modificado de M.Hosfield 1999 [30]

En humanos, las calpaínas se encuentran codificadas en un grupo de 14 genes. Algunas calpaínas se expresan de manera ubícua (1, 2, 5, 7, 10, 12, 14 y 15) mientras que otras son órgano específicas (3, 6, 8, 9, 11 y 13). Estas enzimas catalizan el rompimiento endoproteolítico de sustratos específicos e intervienen en diferentes procesos celulares como la división, diferenciación, re-organización del citoesqueleto, transducción de señales, apoptosis, entre

otros [31]. De acuerdo a su estructura protéica (Figura 7) y distribución tisular, las calpaínas se clasifican en típicas o atípicas [32-34].

Las calpaínas se sintetizan como zimógenos y su activación es dependiente de diversos factores, entre los que predominan la concentración de calcio intracelular, el pH y el inhibidor endógeno de las calpaínas: la calpastatina [29].

Las calpaínas son heterodímeros y contienen una subunidad catalítica (80 KDa) y una subunidad reguladora (28KDa) (Figura 7). Las calpaínas 1 y 2 son las más estudiadas, y también se les conoce como micro( $\mu$ )-calpaína y mili(m)-calpaína respectivamente por su sensibilidad al calcio. La estructura de las calpaínas comprende los siguientes dominios: DI, DII, DIII, DIV o T en la subunidad catalítica y DV y DVI en la subunidad reguladora (Figura 7) [29].

**Tabla 2.** Descripción de la estructura de las calpaínas [32-35].

SUBUNIDAD	DOMINIO	DESCRIPCIÓN
<b>CATALÍTICA</b>	DI	Forma el amino terminal, se autocataliza en presencia de calcio durante la activación inicial de la enzima.
	DII	Se encuentra el sitio activo de la calpaína. Se subdivide en DIIa y DIIb. En presencia de calcio, surge un cambio conformacional y estos subdominios forman el "dominio señal" que contiene al sitio catalítico.
	DIII	Dominio de unión al calcio, funciona como región de unión entre el sitio catalítico y el dominio DIV. Este dominio también está involucrado en los cambios estructurales durante la unión al calcio.
	DIV	Contiene 5 sitios de unión a calcio en motivos "EF-Hand" (cada motivo consiste en 2 alfa hélices conectadas por un asa de aproximadamente 12 aminoácidos con unión a calcio).
	T	Dominio T se encuentra únicamente en las calpaínas atípicas carece de los motivos "EF-hand", sin embargo la activación de éstas calpaínas también es dependiente de calcio.
<b>REGULADORA</b>	DV	Dominio hidrofóbico y tiene un alto porcentaje de glicinas.
	DVI	Este dominio, al igual que el DIV de la subunidad catalítica cuenta con 5 motivos "EF-Hand" sin embargo, no todos son de unión a calcio. El quinto motivo "EF-hand" promueve la dimerización de las subunidades.

Estudios de asociación y de funcionalidad de la actividad de las calpaínas en muestras clínicas, han relacionado a la misma con diversas patologías tales como diabetes mellitus tipo 2, distrofia muscular Limb-Girdle T2, Alzheimer, hipertensión, disfunción hepática y cáncer, entre otras [31, 32, 34].



## 2.6 CALPAÍNA-10 Y DIABETES MELLITUS TIPO 2

El gen de esta enzima (CAPN10) se encuentra localizado en el cromosoma 2q37.3 y cuenta con 15 exones, mismos que generan 8 isoformas (calpaína-10a – 10h) de ARN mensajero (RNAm por sus siglas en inglés) por edición de empalme alternativo (*splicing*).

La calpaína-10a es más abundante en corazón, cerebro, placenta, pulmón, hígado, músculo esquelético, riñón y páncreas endocrino. No obstante, la calpaína-10 no se expresa en ciertos tejidos, tales como páncreas exocrino, tejido ductal y neuronas.

Debido a su estructura, esta proteína es considerada atípica, ya que carece del dominio IV (EF-Hand) [35, 37, 40].

Estudios de mapeo genético identificaron al gen de la calpaína-10 (CAPN10) como el primer gen de susceptibilidad para el desarrollo de la Diabetes Mellitus Tipo 2 en la población mexicano-americana [34]. La identificación del locus de susceptibilidad para la Diabetes Mellitus Tipo 2 constituyó el primer indicio de la relación de una región del genoma en específico y esta enfermedad. Por medio de estudios de clonación posicional en población México-americana se encontró con una combinación de polimorfismos heredados en conjunto (haplotipo) en el gen de la calpaína-10 que confieren susceptibilidad a desarrollar la enfermedad. Este haplotipo de riesgo contiene los siguientes polimorfismos:

- SNP 43 – Homocigoto para el alelo 1 (GG)
- SNP 19 – Heterocigoto – 2 repeticiones de 32 pares de bases (Alelo 1) y 3 repeticiones de 32 pares de bases (Alelo 2)
- SNP 63 – Heterocigoto (CT)

Para la población mexicana se han asociado otros polimorfismos al incremento de riesgo para desarrollar diabetes mellitus tipo 2, tales como el SNP 44 (T → C) y el SNP 110 (A → G). Estos polimorfismos se encuentran en desequilibrio de ligamiento y por lo tanto, no se sabe cuál de los dos resulta ser el responsable directo del aumento del riesgo [34]. Los polimorfismos SNP-43 (rs3792267), SNP-44 (rs2975760), SNP-63 (rs5030952) e InDel-19 (rs3842570) se encuentran ubicados en regiones intrónicas y no afectan la estructura de los aminoácidos de la proteína; sin embargo, pudieran afectar su expresión o el empalme alternativo de la misma [15].

En cuanto a la variante polimórfica InDel-19 se ha observado que los individuos con obesidad con la variante de dos repetidos tienen menos función lipolítica del receptor  $\beta_3$

adrenérgico; sin embargo no se observó el mismo efecto en sujetos sanos [73]. Adicionalmente, se ha observado un alto índice de masa corporal en pacientes portadores de la misma variante en población japonesa [74]. Este polimorfismo también se ha asociado con el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 en pacientes con fibrosis quística, en específico la variante 3R pudiera estar relacionada con este proceso [75]. En niños mexicanos se observó un mayor índice de masa corporal en los sujetos con las variantes SNP-44 T/T e InDel-19 3R/3R; lo anterior aunado a una disminución en los niveles de RNAm y expresión de la proteína en estos sujetos [45].

El gen CAPN10 también ha sido asociado con el síndrome de ovario poliquístico, una enfermedad altamente relacionada con alteraciones en el metabolismo de la glucosa. Un meta análisis mostró que la variante genética InDel-19 está altamente asociada a esta enfermedad [76], 77% de los pacientes con la variante de 3R mostraron además altos niveles de colesterol [77].

Varios estudios han tratado de relacionar el papel de la calpaína-10 con el mecanismo fisiológico de la regulación de glucosa. Hasta el momento, se ha observado que la expresión del RNAm del CAPN10 se encuentra aumentada en islotes pancreáticos de pacientes con diabetes mellitus tipo 2. En sujetos sanos, existe una correlación entre la expresión de RNAm con la secreción de insulina, misma que no se mantiene en pacientes diabéticos [70].

Así mismo, se ha estudiado el papel de las calpaína-10 en el tráfico vesicular de los gránulos secretores de insulina. Estudios han encontrado evidencia de la participación de la calpaína-10 en la exocitosis de insulina (estos experimentos fueron realizados en una línea celular  $\beta$  pancreática, en condiciones dependientes de calcio se observó un incremento en la secreción de insulina derivada de una sobreexpresión de calpaína-10) [71]. Lo anterior sugiere que, a pesar de ser una proteína atípica, su actividad es dependiente de calcio; esto podría indicar que la calpaína-10 funciona como un sensor de corrientes de calcio dependientes de glucosa que estimulan la secreción de los gránulos de insulina.

A nivel periférico, se sabe que las calpaínas participan también en la captura de glucosa en el tejido adiposo y muscular ya que facilitan la translocación del transportador de glucosa GLUT-4 a la superficie de la membrana plasmática [27]. En adipocitos y células musculares de rata se ha observado que la ingesta de glucosa estimulada por insulina se encuentra disminuida si se inhibe la actividad de las calpaínas [72].

## 2.7 LINFOCITO COMO MODELO DE ESTUDIO

El suministro de glucosa en los linfocitos resulta fundamental para la generación de ATP. Los linfocitos T también requieren de este monosacárido para la supervivencia celular, tamaño, activación y producción de citocinas [40, 42].

El ingreso de la glucosa al interior de los linfocitos se lleva a cabo por medio de transportadores de glucosa (GLUT). Los linfocitos expresan GLUT1, GLUT3, GLUT6 y estudios recientes demuestran que en linfocitos de pacientes diabéticos también se expresa el transportador de glucosa GLUT4<sup>3</sup> [48]. En linfocitos de individuos con obesidad y/o con diabetes mellitus tipo 2, se ha encontrado que las enzimas que participan en el metabolismo de la glucosa presentan una baja actividad en comparación a aquellas provenientes de individuos sanos [43]. Además, estudios realizados en ratas Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF)<sup>4</sup> demuestran que la expresión de RNAm de la calpaína-10 se encuentra disminuida en adipocitos, hígado y leucocitos antes de desarrollar hiperglucemia y obesidad [44].

Investigaciones realizadas previamente en el laboratorio reportan que los linfocitos humanos expresan RNAm de calpaína-10, el cual es traducido y da lugar a la síntesis de la enzima. Los datos reportan que la actividad de las calpaínas es dependiente de glucosa y se encuentra disminuida en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 en relación con individuos sanos [39].

El estudio de los mecanismos que regulan la homeostasis de la glucosa en el organismo es relevante para un mejor entendimiento de las funciones fisiológicas y una mejor comprensión de las alteraciones que conllevan a patologías o se derivan de las mismas. Hasta ahora, uno de los principales enfoques de la investigación ha sido dirigido al uso de las células  $\beta$

---

<sup>3</sup> GLUT-4 es un transportador de glucosa expresado principalmente en tejido muscular y tejido adiposo. Su expresión está regulada por la activación del receptor de insulina.

<sup>4</sup> La cepa de Ratas OLETF presenta a las 18 semanas de edad características clínicas y patológicas de la diabetes mellitus tipo 2, ya que desarrolla de manera espontánea hiperglucemia y obesidad.

pancreáticas, hepatocitos, adipocitos y células de músculo liso como modelo. Sin embargo, resulta muy difícil realizar este tipo de investigaciones debido a los métodos altamente invasivos para su obtención.

Debido a la gran importancia de la diabetes mellitus tipo 2 a nivel nacional y a que uno de los elementos indispensables para el adecuado abordaje de esta enfermedad en el país es el ampliar los conocimientos científicos disponibles sobre la misma, resulta importante idear y/o perfeccionar nuevas técnicas para obtener una mayor comprensión sobre los mecanismos fisiológicos que regulan el desarrollo y los efectos de la diabetes mellitus tipo 2 en el cuerpo humano.

### **3 HIPÓTESIS**

La actividad de las calpaínas en respuesta a la glucosa extracelular en células linfoides, será menor en los linfocitos de donadores con el polimorfismo InDel-19 del CAPN10 y en sujetos con diabetes mellitus tipo 2.

### **4 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar si la activación de las calpaínas en respuesta a altas concentraciones extracelulares de glucosa está relacionada con el InDel-19 del gen CAPN10 en linfocitos de sangre periférica humana.

#### **4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ❖ Caracterizar la actividad de calpaínas en la línea celular Jurkat en respuesta a cambios en la concentración de glucosa extracelular.
- ❖ Caracterizar la activación de las calpaínas bajo condiciones de glucosa extracelular en el modelo del linfocito humano.
- ❖ Determinar si la actividad de las calpaínas se encuentra alterada en linfocitos de pacientes diabéticos.
- ❖ Evaluar si el polimorfismo InDel-19 de CAPN10 afecta la actividad de las calpaínas en respuesta a cambios en la glucosa extracelular en linfocitos de donadores sanos.

## 5 DISEÑO EXPERIMENTAL

### 5.1 MATERIALES Y EQUIPO

Tubos con Heparina, Histopaque 1077<sup>®</sup>, Fluorómetro de placas Fluoroskan Ascent<sup>®</sup>, glucómetro Accu-Check<sup>®</sup>. sustrato CMAC, t-BOC-Leu-Met, Citofluorómetro GUAVA.

### 5.2 SOLUCIONES

#### 5.2.1 KRB

Se preparó 1L de solución amortiguadora KRB (NaCl 125 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2 mM, KCl 4.7 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, D-Glucosa 5.6 mM, HEPES 10 mM) con agua destilada. Los solutos se disolvieron en el orden enlistado. El pH fue ajustado con NaOH a 7.4 y posteriormente fue filtrado con membrana 0.22 μM. La solución se guardó a 4 °C.

#### 5.2.2 KRH

La solución amortiguadora Krebs Ringer Hepes (KRH) (HEPES 25 mM, NaCl 115 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM, KCl 5 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM) fue preparada con agua destilada. Los solutos se disolvieron en el orden enlistado. El pH fue ajustado con NaOH a 7.4 a una temperatura constante de 37 °C. Posteriormente el buffer fue filtrado con membrana 0.22 μM en condiciones estériles. La solución se guardó a 4 °C.

#### 5.2.3 SUSTRATO PARA MEDIR LA ACTIVIDAD DE CALPAÍNAS

Se utilizó el sustrato CMAC, t-BOC-Leu-Met (7-Amino-4-Chlorometilcumarina, t-BOC-L-Leucil-L-Metionin amida, PM: 554.1), éste fue disuelto en DMSO (estéril), llevándolo a una concentración de 10 mM y se guardó a -20 °C. Para el ensayo el sustrato se utilizó a una concentración de 10 μM en solución amortiguadora (KRB o KRH) para cada una de las concentraciones de glucosa utilizadas: 70, 100, 200, y 280 mg/dL (3.9, 5.6, 11.1 y 15.6 mM respectivamente).

#### 5.2.4 GLUCOSA

Se preparó una solución *stock* de glucosa a 0.1 M la cual se diluyó en las soluciones KRB y KRH hasta alcanzar las concentraciones requeridas para cada experimento.

## 5.3 MÉTODOS

### 5.3.1 CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES

Se utilizó la línea celular Jurkat<sup>5</sup> de origen linfoide. Las células fueron descongeladas y lavadas con medio RPMI-1640 sin suplementar, centrifugando a 1200 rpm durante 7 minutos.

El sobrenadante se eliminó y las células fueron resuspendidas en 2 mL de medio RPMI suplementado (1% de aminoácidos esenciales, 1% piruvato, 1% glutamina, 1% antibiótico y 10% de suero fetal bovino). Las células se propagaron a 37 °C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 horas.

Se contó y evaluó la viabilidad celular mediante citofluorometría de flujo utilizando el reactivo ViaCount® (Guava Millipore). Para realizar los experimentos se utilizaron cultivos cuya viabilidad fue mayor o igual a 85%.

### 5.3.2 OBTENCIÓN DE LINFOCITOS HUMANOS

Previo a cualquier procedimiento se obtuvo el consentimiento explícito de los donadores. Posteriormente se tomaron aproximadamente 10 mL de sangre periférica de los donadores a través de venopunción por el método de Vacutainer utilizando tubos con heparina. Los linfocitos se aislaron de sangre periférica mediante un gradiente de Ficoll - Histopaque 1077® (Sigma) (1:1.5). Las muestras se centrifugaron a 1600 rpm durante 30 minutos. Posteriormente los leucocitos fueron lavados con PBS o medio RPMI-1640 sin suplementar. Se realizó el conteo de células y se les midió la viabilidad como fue descrito para las líneas celulares. Las células utilizadas para los experimentos tuvieron una viabilidad igual o mayor a 90% y se utilizaron inmediatamente para realizar los experimentos.

Todos los pacientes diabéticos se encontraban en control glucémico al momento de realizar los experimentos.

---

<sup>5</sup> Línea celular derivada de células de leucemia de linfocitos T.

### 5.3.3 ACTIVIDAD DE CALPAÍNAS

Para la línea celular Jurkat se contó el número de células y se les midió la viabilidad usando el reactivo ViaCount®. Las células fueron separadas en cuatro grupos (uno por cada concentración de glucosa utilizada: 70, 100, 200, y 280 mg/dL). Se eliminó el medio RPMI-1640 mediante centrifugación a 3000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos. Las células se resuspendieron en 1 mL de buffer KRH (70 mg/dL de glucosa) y se incubaron a 37 °C durante 2 horas. Después de la incubación, se centrifugó a 4000 rpm por 5 minutos. Las células fueron resuspendidas en KRH con las concentraciones de glucosa e incubadas durante un periodo de 1 hora a 37 °C. Posterior a esto se colocaron en una placa de 96 pozos. Se adicionó el amortiguador con el sustrato CMAC, t-BOC-Leu-Met en condiciones de oscuridad. La actividad de las calpaínas se determinó por medio de degradación del sustrato CMAC, t-BOC-Leu-Met, monitoreando la cinética enzimática de fluorescencia con el Fluorómetro de placas Fluoroskan Ascent®. Se realizó esta medición cada minuto durante 80 minutos a 37 °C con agitación constante. Se realizaron tres réplicas técnicas por experimento en cada condición. Se utilizó como blanco la mezcla del sustrato con el buffer KRH a una concentración de 100 mg/dL de glucosa.

Para los linfocitos aislados de sangre periférica se realizó el mismo procedimiento para medir la actividad de las calpaínas establecido para las células Jurkat, con la excepción de que no se realizó la incubación de 2 horas en KRH con 70 mg/dL de glucosa, antes de resuspender las células en cada concentración de glucosa y la medición de la actividad de las calpaínas se realizó inmediatamente al resuspender las células con su respectivo amortiguador. Se utilizó como blanco la mezcla de sustrato con el buffer KRH de concentración 100 mg/dL de glucosa.



### 5.3.4 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA EN SANGRE

La concentración de glucosa en sangre se determinó utilizando un glucómetro digital (Accu-Check®, Roche). Los donadores que tuvieron una concentración de glucosa en ayunas de 99 mg/dL o menor fueron considerados como normoglicémicos. Los donadores que presentaron hiperglucemia fueron notificados y se les sugirió acudir al médico en caso de que los niveles alcanzaran 110 mg/dL.

### 5.4 DETERMINACIÓN DE POLIMORFISMOS EN EL GEN CAPN10 (InDel-19)

El análisis de la determinación de los polimorfismos se realizó con la asesoría de la Dra. Patricia Mendoza Lorenzo. Se utilizaron las condiciones descritas en el artículo publicado previamente por este grupo de trabajo. Brevemente, el DNA se extrajo de los linfocitos previamente aislados de las muestras de sangre (siguiendo el protocolo descrito en la bibliografía) [45]. Para la extracción del DNA se utilizó un kit Nonidet P-40 (Igepal CA-630, 13 021 Sigma-Aldrich). El DNA genómico se resuspendió en un buffer TE, y se cuantificó en un espectrómetro Nanodrop-1000 (Thermo Fisher Scientific, Inc.). Posteriormente se guardó a una temperatura  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  previo al procesamiento de la muestra.

El polimorfismo InDel-19 (rs3842570, nucleótido 5415 2→3 repeticiones de 32 pb<sup>6</sup>) se identificó mediante la amplificación de productos por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando los siguientes cebadores: F5'-gtt tgg ttc tct tca gcg tgg ag-3' y R5'-cat gaa ccc tgg cag ggt cta ag-3'. La prueba de amplificación PCR se realizó con 40 ng de DNA genómico. El alelo 1 (dos repeticiones de 32 pb) y el alelo 2 (tres repeticiones de 32 pb) fueron identificados de los fragmentos de 155 pb y 187 pb respectivamente.

---

<sup>6</sup> Pares de bases.

## 5.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

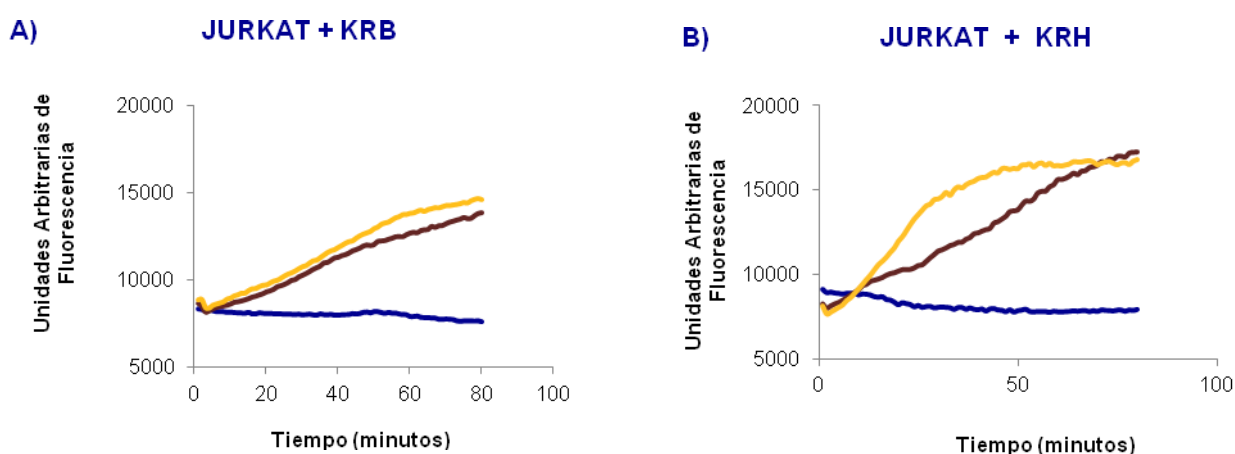
El análisis estadístico para las pruebas en cuyos datos se obtuvo una distribución normal, se realizó mediante la prueba de análisis de varianza de una sola vía o *ANOVA* seguida de la prueba post-hoc denominada Bonferroni.

Para las pruebas cuyos datos presentaron una distribución no normal, el análisis estadístico se realizó mediante la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis; posteriormente se aplicó la prueba post-hoc de Dunn. En todos los casos un valor de  $p$  menor a 0.05 de dos colas es considerado estadísticamente significativo.

## 6 RESULTADOS

Se seleccionó la línea celular Jurkat de origen linfoide para establecer un modelo de estudio que fuera reproducible y nos permitiera descartar las variaciones intrínsecas presentes en los seres humanos.

Para caracterizar la actividad de las calpaínas en este modelo se siguió la metodología descrita en la bibliografía [39]; sin embargo, adicionalmente se utilizó una solución amortiguadora alternativa (KRH) debido a que dicho diseño experimental utiliza un amortiguador que requiere prepararse en fresco y en grandes cantidades (KRB). Por lo tanto se comparó la actividad de calpaínas con ambas soluciones amortiguadoras. En la Gráfica 1 se presentan las cinéticas de actividad con KRB y KRH bajo condiciones de 100 y 280 mg/dL extracelular de glucosa. Los resultados muestran que la actividad de las calpaínas fue mayor en las células que se expusieron a una concentración hiperglicémica de 280 mg/dL utilizando KRH.



**Gráfica 1. Cinéticas representativas de la actividad de las calpaínas en células Jurkat. A)** Células incubadas con el amortiguador KRB. **B)** Células incubadas con el amortiguador KRH. En las gráficas anteriores se muestra el blanco de la placa (—) agregando únicamente buffer KRB y la actividad de las calpaínas correspondientes a la incubación con 100 mg/dL (—) y 280 mg/dL de glucosa (—).

Dado que los datos con las células Jurkat indicaron diferencias en la actividad de las calpaínas relacionada con la solución amortiguadora, se buscaron las posibles causas de este

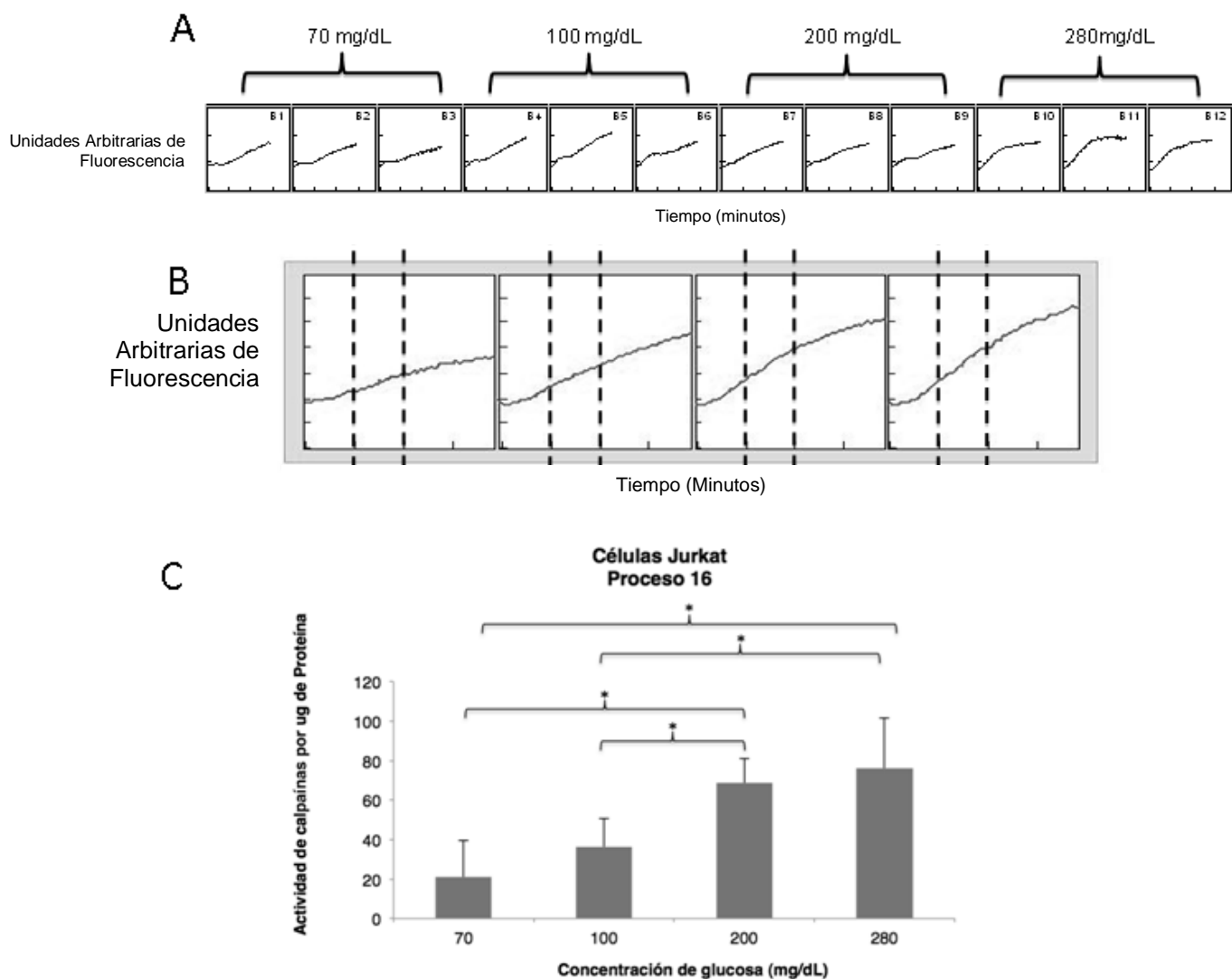
efecto. En la literatura se encontró un reporte que muestra que hay variaciones en el pH de la solución amortiguadora KRB [46], por lo que se procedió a analizar las variaciones en pH. Previo a la realización de los experimentos, la solución de KRB se mantuvo a 4 °C (temperatura sugerida en la literatura) y en condiciones estériles; nuestras observaciones confirmaron lo reportado en la bibliografía, ya que se encontraron variaciones considerables en el pH de la solución a través del tiempo (Tabla 3). Para nuestros experimentos, el pH resulta muy relevante, ya que la reacción debe ser evaluada en condiciones fisiológicas.

**Tabla 3.** Cambios del pH de la solución KRB a través del tiempo.

<b>Horas post-preparación</b>	<b>pH KRB</b>
0 (momento de elaboración)	7.468
24	7.55
48	8.095
92	8.610

Estos datos indicaron que el pH de la solución amortiguadora KRB no es estable. Mientras que la medición del pH en el amortiguador KRH no mostró cambios evidentes a través del tiempo, por lo que se procedió a seguir evaluando la actividad de las calpaínas utilizando el KRH como solución amortiguadora alternativa.

Considerando que la activación de las calpaínas puede estar relacionada con la inducción de la apoptosis y que la hiperglucemia induce muerte celular, se determinó el efecto de la glucosa en la activación de las proteasas bajo una alta concentración extracelular de glucosa menor a 280 mg/dL; por lo cual la evaluación también se realizó a concentraciones de 200 mg/dL y 70 mg/dL de glucosa. La actividad de las calpaínas aumentó significativamente a las concentraciones de 11.1 y 15.6 mM de glucosa (Gráfica 2). Cabe mencionar que no se encontraron variaciones en la medición de las unidades arbitrarias de fluorescencia de los blancos (condición con el sustrato, pero sin células) con distintas concentraciones de glucosa, por lo que en las gráficas de este trabajo únicamente se mostrarán las mediciones de la solución blanco en una sola concentración de glucosa.



**Gráfica 2. A)** Cinéticas representativas de la actividad de las calpaínas de las células Jurkat con la técnica estandarizada. **B)** Las líneas punteadas muestran la zona de la gráfica utilizada para realizar el análisis comparativo de las distintas actividades presentadas de acuerdo a las diferentes concentraciones de glucosa utilizadas. A este segmento se le denominó Proceso 16. **C)** Histograma de la actividad de las calpaínas ajustada por concentración de proteínas totales en células Jurkat. Las barras muestran el promedio  $\pm$  la desviación estándar de 4 experimentos por triplicado. El análisis estadístico se hizo por medio de la prueba ANOVA-Bonferroni como se muestra en la metodología. \*  $p < 0.05$ .

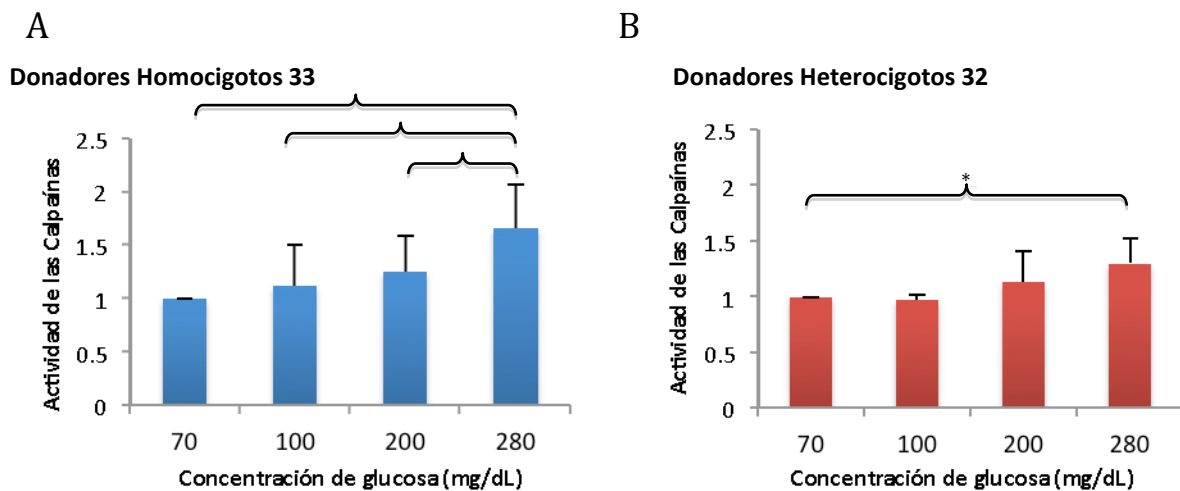
Posteriormente, se procedió a evaluar la actividad de las calpaínas con respecto a la concentración de glucosa utilizando linfocitos de donadores sanos utilizando el amortiguador que mostró ser más estable (KRH). Los resultados fueron similares a los encontrados con la línea celular Jurkat (Gráfica 3C), las diferencias encontradas en la actividad fueron estadísticamente significativas entre las concentraciones de 200 y 280 mg/dL de glucosa.

Con el objetivo de evaluar alteraciones en la actividad de calpaínas en linfocitos de pacientes con diabetes, se realizaron experimentos con linfocitos extraídos de donadores con la enfermedad. En la Gráfica 3 se muestran las cinéticas representativas del patrón de la actividad de calpaínas obtenida en donadores sanos y pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (Gráfica 3 A y B). En pacientes diabéticos se observa una menor sensibilidad ante los cambios de glucosa en comparación con el patrón de respuesta de los individuos sanos (Gráfica 3 A, C y D). Adicionalmente, los resultados muestran que los linfocitos de los individuos diabéticos presentaron una actividad basal de calpaínas menor a la de los individuos sanos (Gráfica 3 B).

Estos datos coinciden con los reportados anteriormente en la bibliografía [39] por lo que podemos inferir que nuestros resultados muestran las diferencias presentadas por los individuos de manera intrínseca y no son derivadas de factores metodológicos. Lo anterior nos permitió continuar con la evaluación de las diferencias genéticas entre los individuos y su posible participación en la actividad de las calpaínas.



Para evaluar la posible influencia de la variabilidad genética en la activación de las calpaínas se genotipificaron 20 donadores sanos. Específicamente se evaluó si la actividad enzimática presenta diferencias como resultado del polimorfismo InDel-19 (Gráfica 4). Los resultados mostraron que no existen diferencias estadísticamente significativas en la activación de las calpaínas en individuos con diferente genotipo del InDel-19, sin embargo, se observó una tendencia hacia una menor activación de las calpaínas en individuos con el polimorfismo de riesgo (3/2) en comparación con la actividad de los de individuos con el genotipo 3/3.



**Gráfica 4. Análisis de la actividad de las calpaínas en donadores sanos con el genotipo InDel-19 del gen CAPN10. A)** Histograma de la actividad de las calpaínas en donadores homocigotos (33), las barras muestran el promedio obtenido de a partir de los datos de 12 donadores; el análisis estadístico se hizo por medio de la prueba ANOVA-Bonferroni. \*  $p < 0.05$ . **B)** Histograma de la actividad de las calpaínas en donadores heterocigotos (32), las barras muestran el promedio obtenido de a partir de los datos de 8 donadores. El análisis estadístico se realizó con una prueba Kruskal-Wallis-Dunn, \*  $p < 0.05$ . Los datos se normalizaron estableciendo la actividad obtenida con 70 mg/dL de glucosa como el valor 1 (actividad basal de cada individuo).



## 7 DISCUSIÓN

La diabetes mellitus tipo 2 es una enfermedad cada día más común alrededor del mundo, su estudio y comprensión resultan indispensables para el desarrollo de nuevas terapias para su prevención y tratamiento.

Las células linfoides tienen un papel muy importante en la respuesta inmune y en los procesos inflamatorios, son células metabólicamente muy activas ya que sintetizan citocinas y quimiocinas en altas cantidades. La principal fuente metabólica de estas células está dada por la glucosa y la glutamina. La regulación de los procesos bioquímicos que mantienen la homeostasis en estas células es de gran importancia para la salud [48]. Se ha observado en enfermedades que afectan la homeostasis de la glucosa, por ejemplo en los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 se encuentran más expuestos a infecciones que los organismos de individuos sanos posiblemente derivadas de alguna alteración de las funciones de las células linfoides, posiblemente relacionada con la baja regulación del metabolismo de la glucosa o a la glucotoxicidad [49-54]. A pesar de estos importantes cambios que se han observado en la respuesta inmune en pacientes con diabetes mellitus tipo 2, las modificaciones en el metabolismo de las células linfoides derivados de la enfermedad no han sido completamente dilucidadas.

El objetivo de este trabajo fue evaluar si la activación de las calpaínas en respuesta a altas concentraciones extracelulares de glucosa está relacionada con el InDel-19 del gen CAPN10 en linfocitos de sangre periférica humana. Para ello, se evaluaron los cambios en la actividad general de las calpaínas en células incubadas con diferentes concentraciones de glucosa extracelular.

Los resultados obtenidos a partir de los estudios realizados en células Jurkat muestran que éstas responden a cambios en las concentraciones extracelulares de glucosa, aumentando la actividad enzimática de las calpaínas de manera significativa con altas concentraciones extracelulares de glucosa. De igual manera, ante concentraciones altas de glucosa extracelular, aumenta la actividad de los leucocitos de individuos sanos. En contraste con los resultados en individuos sanos, los individuos con diabetes mellitus tipo 2 presentan menor actividad de las

calpaínas y sus leucocitos no responden a los cambios de concentración extracelular de glucosa a través de la activación de estas proteasas.

En la población mexico-americana se han descrito variantes genéticas en CAPN10 que confieren susceptibilidad al desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2. Resulta relevante el estudio de estas variantes para conocer si existe una correlación entre las modificaciones del gen y la expresión y actividad de la enzima para la cual codifica.

En un estudio previo realizado en 161 niños de población mexicana con peso normal, sobrepeso y obesidad, se observó una disminución en la expresión del RNA mensajero de la calpaína-10 en los grupos de niños con sobrepeso u obesidad. Interesantemente, la mayoría de los niños en ambos grupos presentaron el genotipo InDel-19 considerado de riesgo para el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2 (3/2). Adicionalmente, los grupos de sobrepeso y obesidad reportaron una disminución en la expresión de la isoforma 10a de la calpaínas-10 [45].

Los resultados obtenidos en este estudio con leucocitos de donadores adultos sanos cuyo genotipo fue heterocigoto 3/2, muestran una disminución de la actividad de calpaínas ante altas concentraciones de glucosa extracelular. Lo anterior arroja una perspectiva de trabajo para evaluar la expresión del RNAm en individuos adultos sanos e incrementar el número de muestra de los donadores con la finalidad de conocer si las diferencias tanto en la expresión como en la actividad enzimática de las calpaínas son significativas.

Investigaciones sugieren que la expresión de la calpaína-10 (RNAm y proteína) no se encuentra disminuida en músculo esquelético [64], ni en leucocitos de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 [39], sugiriendo que los niveles de la proteína no son afectados durante el desarrollo de la enfermedad; será importante elucidar si la actividad de las proteasas pudiera participar en el desarrollo de la patología.

La actividad de las calpaínas es modificada por procesos como la unión a calcio, fosforilaciones, unión a fosfolípidos e incluso por su localización celular [65,66], por lo que es probable que la disminución de la actividad de las calpaínas en los sujetos diabéticos se deba a alteraciones en alguno de los procesos mencionados. Es probable que las condiciones hiperglicémicas presentes en los individuos con diabetes mellitus tipo 2 puedan afectar de manera significativa la actividad de la calpaína-10 tanto en linfocitos como en células  $\beta$  pancreáticas [39, 79]. En la literatura también se sugiere que la hiperglucemia crónica tiene un

efecto de regulación negativa sobre la calpaína-10 mitocondrial, lo que contribuye a la muerte de células renales [57].

Estudios previos han demostrado que el metabolismo de la glucosa juega un papel relevante en la función y supervivencia de las células linfoides. Se ha descrito anteriormente que un decremento sustancial en la ingesta de la glucosa de estas células activa a miembros de la familia de proteínas proapoptóticas Bcl-2, conduciendo a la muerte celular de los linfocitos. Por el contrario, en condiciones hiperglucémicas, se obtienen respuestas inmunológicas exacerbadas y posiblemente se deriven algunas patologías [58]. Por otra parte, se ha reportado la participación de las calpaínas en diversos procesos celulares, entre los que se incluye la apoptosis [59], de manera que la integridad celular fue importante para poder corroborar que la actividad general de las calpaínas, no fuera derivada de un proceso de muerte celular. Por ello, todos los ensayos presentados en este trabajo se llevaron a cabo durante las primeras 8 horas a partir de la obtención de linfocitos y nuestros experimentos se realizaron con células que tuvieron una viabilidad >90%.

Las células linfoides expresan los transportadores de glucosa GLUT1, GLUT3, GLUT4 (cuando éstos se encuentran en proliferación y en respuesta a la insulina) y GLUT6 [48, 49, 56, 61]. El transportador GLUT3 está principalmente contenido en vesículas intracelulares en el modelo de macrófagos, mismas que pueden externalizarse y fusionarse con la membrana plasmática celular en respuesta a un incremento en las concentraciones extracelulares de glucosa [62], sin embargo, los mecanismos moleculares que se llevan a cabo para la externalización de este transportador aún no han sido descritos. Debido a que las calpaínas han sido asociadas con la externalización de los transportadores de glucosa en distintos tipos celulares (adipocitos, células de músculo esquelético y células pancreáticas) [67, 71, 78] las calpaínas podrían estar involucradas en la regulación de los transportadores de glucosa en el linfocito. Estas premisas arrojan nuevas perspectiva de trabajo en la cual se pudiera estudiar los mecanismos de externalización de los transportadores de glucosa en linfocitos y la expresión de transportadores de glucosa en sujetos con distinto genotipo para CAPN10 y en específico con el haplotipo de riesgo descrito anteriormente.

Los efectos de la inhibición de la actividad de las calpaínas han sido directamente relacionados con una menor captación de glucosa en tejidos periféricos [79, 80]. En linfocitos,

aún en estado quiescente, es necesario mantener la homeostasis de la glucosa para poder sostener las tasas metabólicas necesarias para la respuesta inmune. Considerando que las calpaínas participan en diversos procesos en células linfoides (proceso de migración de los linfocitos al sitio de inflamación [69], la adhesión al endotelio, quimiotaxis, fagocitosis, etc.) y que una característica de los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 es que presentan una disminución en la respuesta inmune y una mayor exposición a enfermedades que los individuos sanos, será importante realizar estudios para dilucidar si la inhibición de la actividad de las calpaínas, podría resultar en una menor capacidad del organismo para responder adecuadamente a factores infecciosos.

## 8 CONCLUSIONES

Los resultados en esta investigación muestran lo siguiente:

- i) La línea celular Jurkat responde a los cambios de glucosa extracelular presentando activación de las calpaínas.
- ii) Los linfocitos de donadores sanos responden de manera similar a la línea celular Jurkat a los cambios de concentración de glucosa.
- iii) Se observa una tendencia a la disminución de la capacidad de respuesta de las células de individuos con el haplotipo de riesgo InDel-19 (3/2) en comparación con las células de donadores con genotipo 3/3.
- iv) Los linfocitos de donadores con diabetes mellitus tipo 2 presentan una actividad de las calpaínas basal menor a la observada en linfocitos sanos.
- v) Las células de donadores con diabetes mellitus tipo 2 presentan una menor sensibilidad a responder ante los cambios de concentración de glucosa extracelular en comparación a la presentada por individuos sanos.

## 9 REFERENCIAS

1. *Programa de acción: Diabetes Mellitus, SSA 2001*
2. DIABETES, Organización Mundial de la Salud - Nota descriptiva N°312, Septiembre 2011.  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/index.html>
3. Diamond J. *The double puzzle of diabetes*. Nature, 2003. 423(6940): P.599-602.
4. Marx, J. *Unraveling the causes of diabetes*. Science, 2002. 296(5568):p.686-689.
5. American Diabetes Association. *Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*. Diabetes Care, 2011. 34, Supl1: p. S62-9.
6. [www.idf.org/types-diabetes](http://www.idf.org/types-diabetes)
7. Barazzoni, R., et al. *Increased fibrinogen production in type 2 diabetic patients without detectable vascular complications: correlation with plasma glucagon concentrations*. J Clinical Endocrinol Metab, 2000. **85**(9):p.3121-5.
8. Reaven, G.M., et al., *Documentation of hyperglucagonemia throughout the day in nonobese and obese patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus*. J Clin Endocrinol Metab, 1987. **64**(1):p.106-10.
9. Kadowaki T., et al., *A subtype of diabetes mellitus associated with a mutation of mitochondrial DNA*. New England Journal of Med, 1994. 7;**330**(14):962-8.
10. van der Vorm ER, et al. *A mutation in the insulin receptor that impairs proreceptor processing but not insulin binding*. J Biol Chem. 1994. **269**(19):14297-302.
11. Dean L, McEntyre J. *The Genetic Landscape of Diabetes* [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); **2004**. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1667/>
12. Gregory A. Nichols. *Re-thinking the Diagnosis of Diabetes: Is A1C the Final Answer?*. Medscape. Feb 09, 2010.
13. Kaput, J. and K. Dawson. *Complexity of type 2 diabetes mellitus data sets emerging from nutrigenomic research: a case for dimensionality reduction?* Mutat Res, 2007. 622(1-2)p.19-32.
14. Hanis, C.L. et al., *A genome-wide search for human non-insulin dependent (type 2) diabetes genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 2*. Nat Genet, 1996. 13(2):p.161-6.
15. Horikawa, Y., et al., *Genetic Variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus*. Nat Genet, 2000. 26(2): p. 163-75.
16. Guyton, John E. Hall. *Textbook of Medical Physiology*. 11<sup>th</sup> Edition, 2006. Page 809; **67**: 829-838; **71**: 865-878; **78**: 961-976.

17. Barrett, E.J., *The Endocrine Pancreas*, in *Medical Physiology*, W.F. Boron and E.L. Boulpaep, Editors. 2005, Elsevier Saunders: Philadelphia, Pennsylvania. p. 1066-1085.
18. Poitout, V. and R.P. Robertson, *An integrated view of beta-cell dysfunction in type-II diabetes*. *Annu Rev Med*, 1996. **47**: p. 69-83.
19. Saltiel, A.R. and C.R. Kahn, *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism*. *Nature*, 2001. **414**(6865): p. 799-806.
20. Barg, S., *Mechanisms of exocytosis in insulin-secreting B-cells and glucagon-secreting A-cells*. *Pharmacol Toxicol*, 2003. **92**(1): p. 3-13.
21. Hiriart, M. and R. Vidaltamayo, *Cuestión de hormonas: el papel de las hormonas del páncreas en la salud y en la diabetes*. *Ciencia*, 2002. **53**(3): p. 36-45.
22. Henquin, J.C., et al., *Hierarchy of the beta-cell signals controlling insulin secretion*. *Eur J Clin Invest*, 2003. **33**(9): p. 742-50.
23. Ashcroft, F.M., et al., *Stimulus-secretion coupling in pancreatic beta cells*. *J Cell Biochem*, 1994. **55 Suppl**: p. 54-65.
24. MacDonald, P.E., J.W. Joseph, and P. Rorsman, *Glucose-sensing mechanisms in pancreatic beta-cells*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2005. **360**(1464): p. 2211-25.
25. Ashcroft, F.M. and P. Rorsman, *Electrophysiology of the pancreatic beta-cell*. *Prog Biophys Mol Biol*, 1989. **54**(2): p. 87-143.
26. Hiriart, M. and D.R. Matteson, *Na channels and two types of Ca channels in rat pancreatic B cells identified with the reverse hemolytic plaque assay*. *J Gen Physiol*, 1988. **91**(5): p. 617-39.
27. Hiroyuki Sorimachi, et al., *Calpain chronicle—an enzyme family under multidisciplinary characterization*. *Proc. Jpn. Acad.*, 2011. Ser. B **87**: 287-327.
28. Hosfield, C.M., et al., *Crystal structure of calpain reveals the structural basis for Ca<sup>2+</sup>-dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation*. *EMBO J*, 1999. **18** (24): p. 6880–6889.
29. Turner MD, et al., *Calpain facilitates actin reorganization during glucose-stimulated insulin secretion*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007 **19**;352(3):650-5.
30. Harris, F., et al., *Calpains and their multiple roles in diabetes mellitus*. *Ann N Y Acad Sci*, 2006. **1084**: p. 452-80.
31. Huang, Y. and K.K. Wang, *The calpain family and human disease*. *Trends Mol Med*, 2001. **7**(8): p. 355-62.
32. Zatz, M. and A. Starling, *Calpains and disease*. *N Engl J Med*, 2005. **352**(23): p. 2413-23.

33. Ma, H., et al., *Characterization and expression of calpain 10. A novel ubiquitous calpain with nuclear localization.* J Biol Chem, 2001. **276**(30): p. 28525-31.
34. Del Bosque-Plata, L., et al., *Association of the calpain-10 gene with type 2 diabetes mellitus in a Mexican population.* Mol Genet Metab, 2004. **81**(2): p. 122-6.
35. Turner, M.D., *Coordinated control of both insulin secretion and insulin action through calpain-10-mediated regulation of exocytosis?* Mol Genet Metab, 2007. 91(4): p. 305-7.
36. Song, Y., et al., *Are variants in the CAPN10 gene related to risk of type 2 diabetes? A quantitative assessment of population and family-based association studies.* Am J Hum. Genet, 2004. **74**(2): p. 208-22.
37. Cox NJ, et al., *Calpain 10 and genetics of type 2 diabetes.* Curr Diab Rep 2002. 2: p.186-190.
38. Drozdowski LA, Thomson AB. *Intestinal Sugar Transport.* World J Gastroenterol, 2006. 12(11): 1657-70.
39. Diaz-Villaseñor, A., et al., *The activity of calpains in lymphocytes is glucose-dependent and is decreased in diabetic patients.* Blood Cells Mol Dis, 2008. 40(3): p. 414-419.
40. Fox, C., et al., *Fuel feeds function: energy metabolism and the T-cell response.* NAt Rev Immunol, 2005. 5: p. 844-52.
41. Szablewski, I., et al., *Glut4 is expressed in circulating lymphocytes of diabetic patients. A method to detect early prediabetic stages?* Diabetología Croatica, 2007. 36(4): p. 69-76.
42. Nancie J Maclver, et al., *Glucose metabolism in lymphocytes is a regulated process with significant effects on immune cell function and survival,* Jour of Leukocyte Biol, 2008.
43. Curto, M., et al., *Insulin resistance in obese subjects and newly diagnosed NIDDM patients and derangements of pyruvate dehydrogenase in their circulating lymphocytes.* Int J Obes Relat Metab Disord, 1997. **21**(12): p. 1137-42.
44. Y. Sato, M. Kuwajima, H. Kamiya, H. Harashima, *Calpain 10 as a predictive gene for type 2 diabetes: evidence from a novel screening system using white blood cells of Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats,* Biol. Pharm. Bull. **26** (2003) 1765–1768.
45. Mendoza-Lorenzo P., et al., *The reduction of Calpain-10 expression is associated with risk polymorphisms in obese children.* Gene, 2013. **516**: 126–131.
46. Lelong IH, Rebel G. *pH drift of "physiological buffers" and culture media used for cell incubation during in vitro studies.* J Pharmacol Toxicol Methods, 1998. **39**(4):203-10.
47. Angele MK, et al., *Surgical trauma and immunosuppression: pathophysiology and potential immunomodulatory approaches.* Langenbecks Arch Surg, 2005. **390**:333–41.



48. Oleszczak, B., et al., *The effect of hyperglycemia and hypoglycemia on glucose transport and expression of glucose transporters in human lymphocytes B and T: an in vitro study*. *Diabetes Res Clin Pract.*, 2012. **96(2)**:170-8.
49. Fu, Y., et al., *Facilitative glucose transporter gene expression in human lymphocytes, monocytes, and macrophages: a role for GLUT isoforms 1, 3, and 5 in the immune response and foam cell formation*. *Blood Cells Mol Dis*, 2004. **32(1)**: p. 182-90.
50. Devrajani BR, et al., *Type 2 diabetes mellitus: a risk factor for Helicobacter pylori infection: a hospital based case-control study*. *Int J Diab Dev Countries* , 2010. **30**:22-6.
51. Rahman A., et al., *Helicobacter pylori infection and inflammation: implications for pathophysiology of diabetes mellitus and coronary heart disease*. *J Life Sci*, 200. **1**:45-50.
52. Heymann AD, et al., *Diabetes as a risk factor for herpes zoster infection: results of a population-based study in Israel*. *Infection*, 2008. **36**:226-30.
53. Otton R, et al., *Diabetes causes marked changes in lymphocyte metabolism*. *J Endocrinol*, 2002. **174**:55-61.
54. Szablewski L, et al., *Deoxy-D-glucose transport into lymphocytes, granulocytes and erythrocytes in patients with type 2 diabetes mellitus*. *Exp Clin Diabetol*, 2007. **7**:245-55.
55. Doege, H., et al., *Activity and genomic organization of human glucose transporter 9 (GLUT9), a novel member of the family of sugar-transport facilitators predominantly expressed in brain and leucocytes*. *Biochem J*, 2000. **350 Pt 3**: p. 771-6.
56. Maratou, E., et al., *Glucose transporter expression on the plasma membrane of resting and activated white blood cells*. *Eur J Clin Invest*, 2007. **37(4)**: p. 282-90.
57. Covington MD, Schnellmann RG. *Chronic high glucose downregulates mitochondrial calpain 10 and contributes to renal cell death and diabetes-induced renal injury*. *Kidney Int.*, 2012. **81(4)**:391-400
58. MacIver NJ, et al., *Glucose metabolism in lymphocytes is a regulated process with significant effects on immune cell function and survival*. *J Leukoc Biol*, 2008. **81**:919-37.
59. Chakraborti S, et al., *Implications of Calpains in health and diseases*. *Indian J Biochem Biophys*, 2012. **49(5)**:316-28.
60. Knott RM, et al., *Glucose- dependent regulation of DNA synthesis in bovine retinal endothelial cells*. *Curr Eye Res*, 1998. **17**:1-8.
61. Joost HG, et al., *Nomenclature of GLUT/SLC2A family of a sugar/polyol transport facilitators*. *Am. J Physiol*, 2002. **282**:E974-1076.

62. Simpson IA, et al., *The facilitative glucose transporter GLUT3: 20 years of distinction*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008. **295**:E242–53.
63. Frauwirth KA, Thompson CB. *Regulation of T lymphocyte metabolism*. J Immunol, 2004. **172**:4661–5.
64. Norton L, et al., *Calpain-10 gene and protein expression in human skeletal muscle: effect of acute lipid-induced insulin resistance and type 2 diabetes*. Clin Endocrinol Metab, 2008. **93(3)**:992–8.
65. Ono Y, et al., *Calpains: an elaborate proteolytic system*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1824(1)**:224–36.
66. Franco S, Huttenlocher A, *Regulating cell migration: calpains make the cut*. J Cell Sci, 2005. **1;118**:3829–38.
67. Paul D, et al., *Calpain facilitates GLUT4 vesicle translocation during insulin-stimulated glucose uptake in adipocytes*. Biochem J, 2003. **376(3)**:625–32.
68. Huang C, et al., *Arsenic and diabetes: current perspectives*. Kaohsiung J Med Sci, 2011. **27(9)**:402–10.
69. Mikosik A, et al., *Expression of calpain-calpastatin system (CCS) member proteins in human lymphocytes of young and elderly individuals; pilot baseline data for the CALPACENT project*. Immun Ageing, 2013. **10(1)**: 27.
70. Ling C, et al. *Calpain-10 expression is elevated in pancreatic islets from patients with type 2 diabetes*. PloS One, 2009. **4**: e6558.
71. Marshall C, et al. *Evidence that an isoform of calpain-10 is a regulator of exocytosis in pancreatic beta-cells*. Mol Endocrinol, 2005. **19**: 213–224.
72. Sreenan S, Zhou Y, Otani K, et al. *Calpains play a role in insulin secretion and action*. Diabetes 2001; **50**: 2013–2020.
73. Hoffstedt J, Näslund E, Arner P. *Calpain-10 gene polymorphism is associated with reduced beta(3)-adrenoceptor function in human fat cells*. J Clin Endocrinol Metab 2002; **87**: 3362–3367.
74. Shima Y, Nakanishi K, Odawara M, Kobayashi T, Ohta H. *Association of the SNP-19 genotype 22 in the calpain-10 gene with elevated body mass index and hemoglobin A1c levels in Japanese*. Clin Chim Acta 2003; **336**: 89–96.
75. Derbel S, Doumaguet C, Hubert D, et al. *Calpain 10 and development of diabetes mellitus in cystic fibrosis*. J Cyst Fibros 2006; **5**: 47–51.

76. Huang M, Xiao J, Zhao X, Liu C, Chen Q. *Four polymorphisms of the CAPN 10 gene and their relationship to polycystic ovary syndrome susceptibility: a meta-analysis*. Clin Endocrinol (Oxf) 2012; **76**: 431–438
77. Gonzalez A, Abril E, Roca A, et al. *Specific CAPN10 gene haplotypes influence the clinical profile of polycystic ovary patients*. J Clin Endocrinol Metab 2003; **88**: 5529–5536.
78. Logie L, Brown AE, Yeaman SJ, Walker M. *Calpain inhibition and insulin action in cultured human muscle cells*. Mol Genet Metab. 2005 May;85(1):54-60.
79. Lu Tie, et al. *Down-regulation of brain-pancreas relative protein in diabetic rats and by high glucose in PC12 cells: prevention by calpain inhibitors*. J Pharmacol Sci. 2008 Jan;106(1):28-37.
80. Brown AE, Yeaman SJ, Walker M. *Targeted suppression of calpain-10 expression impairs insulin-stimulated glucose uptake in cultured primary human skeletal muscle cells*. Mol Genet Metab. 2007 Aug;91(4):318-24.