



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

PAPEL DE LAS CALPAÍNAS 1, 2 Y 10 EN EL TRANSPORTE DE LA GLUCOSA
DE CÉLULAS LINFOIDES

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:
ADRIANA JUÁREZ NÁJERA

TUTOR PRINCIPAL

DRA. ANA MARÍA SALAZAR MARTÍNEZ
Instituto de Investigaciones Biomédicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. ERNESTO SOTO REYES SOLÍS
Universidad Autónoma Metropolitana

DRA. MARÍA CRISTINA REGINA FERNÁNDEZ MEJÍA
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Ciudad de México, Febrero 2019



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.

A las dos mujeres más importantes en todo universo: mi madre, Ana Magdalena Nájera Vázquez y mi tía, María del Carmen Nájera Vázquez, GRACIAS por su amor y apoyo incondicional.

A mi tío Genaro Nájera por su gran cariño y por nunca dejar de creer en mí.

A la memoria de mi tía, Consuelo Nájera, siempre estarás en mi corazón y en mis chinos.

A mi amigo, Juan Pablo Pánico, por sus sabios consejos y por no dejarme flaquear en los momentos más difíciles de este proyecto.

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

Este trabajo se realizó en el laboratorio A-122 del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas, en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Gracias al financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través del proyecto CONACYT-Ciencia Básica-254305 y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)-UNAM-IN201914.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por haberme otorgado una beca para cursar mis estudios de Maestría a través del Programa de Becas para Estudios de Posgrado.

Agradezco al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP), UNAM, por el apoyo otorgado para asistir al XLIII Congreso Nacional de Genética Humana, “Implicaciones de la Genética y la Genómica para la salud” en el mes de noviembre del año 2017.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A los miembros del jurado de examen:

Dra. Marcia Hiriart Urdanivia
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Dra. Mahara Angélica Valverde Ramírez
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes
Instituto Nacional de Medicina Genómica

Dra. Andrea Sachi Díaz Villaseñor
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dra. Verónica Guarner Lans
Facultad de Medicina, UNAM

Por el tiempo dedicado a la revisión de la presente tesis, y por sus valiosas observaciones y sugerencias, GRACIAS.

A los miembros del comité tutor:

Dr. Ernesto Soto Reyes Solís
Universidad Autónoma Metropolitana

Dra. María Cristina Regina Fernández Mejía
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Dra. Ana María Salazar Martínez
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Por acompañarme en el desarrollo de este proyecto, por su apoyo y por sus sabios consejos, GRACIAS.

A la **QFB Lourdes Monserrat Sordo Cedeño** del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, por el apoyo técnico brindado en la elaboración de esta tesis.

Al **M en C Carlos Castellanos Barba** y al Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, por su apoyo técnico en las determinaciones que se realizaron usando la citometría de flujo.

Al **Dr. Juan Pablo Pánico Molina** por su apoyo técnico y metodológico proporcionado durante la elaboración de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, por haberme brindado la oportunidad de desarrollarme académica, cultural y profesionalmente.

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, a la Facultad de Química y al Instituto de Investigaciones Biomédicas.

A todas las instituciones, organismos, archivos, entre otros, que contribuyeron a facilitarme el acceso a la información requerida para la elaboración de esta tesis.

A mi tutora de tesis, la **Dra. Ana María Salazar Martínez** y a la jefa del grupo, la **Dra. Patricia Ostrosky Wegman** por haberme otorgado la oportunidad de formar parte de su equipo, por compartir su tiempo y sus conocimientos conmigo y por su apoyo en el desarrollo de este proyecto.

A mi madre **Ana Magdalena Nájera Vázquez**, a mi tía **María del Carmen Nájera Vázquez** por apoyarme durante toda mi vida, por amarme por encima de todo, por siempre estar a mi lado, por confiar en mí y por ser lo mejor que me ha pasado en la vida.

A mi tío **Genaro Nájera**, a mi tía **Consuelo Nájera †** y a mi tío **Martín Trejo**, por amarme como a su hija, por escucharme, por sus sabios consejos y apoyarme como solo la familia puede hacerlo.

A mi mentor y amigo, el **Dr. Juan Pablo Pánico Molina** por enseñarme el valor y la importancia de la investigación, por confiar en mí y apoyarme incondicionalmente.

A mis amigas y hermanas del alma, **Dulce Mendarte** y **Caro García**, por su valiosa amistad y cariño, por escucharme y apoyarme en las buenas y en las malas, y nunca permitirme flaquear.

A mi gran amigo **Eduardo Baltazar**, por nunca dejarme sola y apoyarme en los momentos más difíciles.

A mis compañeros, amigos y cómplices en esta gran aventura, **Damián García**, **Quetzally Medina**, **Iovalli Sosa**, **Arelhy Mendez** y **Marisol Martínez**. Gracias por su amistad, y por todos los momentos de felicidad que pase a su lado.

A mis amigos **Julian** y **Pablo García** por su apoyo y comprensión en la recta final de este proyecto.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	II
ABREVIATURAS.....	III
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	4
EL SISTEMA PROTEOLÍTICO DE LAS CALPAÍNAS	4
LA ACTIVACIÓN DE LAS CALPAÍNAS EN LA REGULACIÓN DE PROCESOS FISIOPATOLÓGICOS.....	6
HERRAMIENTAS PARA EL ESTUDIO DE LAS CALPAÍNAS	8
LAS CAPN1 Y CAPN2 PARTICIPAN EN LA SECRECIÓN DE INSULINA Y EN EL TRANSPORTE DE GLUCOSA	10
LA CAPN10 EN LA DIABETES Y EN LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA.....	12
EL LINFOCITO COMO MODELO DE ESTUDIO EN EL TRANSPORTE DE LA GLUCOSA.....	15
JUSTIFICACIÓN	18
HIPÓTESIS	19
OBJETIVO GENERAL	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA DE LA ACTIVIDAD DE CALPAÍNAS Y CATEPSINAS.....	19
CÉLULAS <i>KNOCKDOWN</i> :	19
MATERIAL Y MÉTODOS	20
LINFOCITOS EXTRAIDOS DE SANGRE PERIFÉRICA.....	20
OBTENCIÓN DE SANGRE PERIFÉRICA DE DONADORES Y DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS; SEPARACIÓN Y SIEMBRA DE LINFOCITOS	20
TRATAMIENTO CON INHIBIDORES FARMACOLÓGICOS DE CALPAÍNAS O DE CATEPSINAS	20
ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD EN LINFOCITOS TRATADOS CON INHIBIDORES FARMACOLÓGICOS	21
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE CALPAÍNAS POR HIDRÓLISIS DEL SUSTRATO CMAC, T-BOC-LEU-MET EN LINFOCITOS TRATADOS CON INHIBIDORES FARMACOLÓGICOS.....	22
CAPTACIÓN DE GLUCOSA POR MÉTODO COLORIMÉTRICO EN LINFOCITOS TRATADOS CON INHIBIDORES FARMACOLÓGICOS	23
ABUNDANCIA DE GLUT1 EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA POR INMUNOTINCIÓN EN LINFOCITOS TRATADOS CON INHIBIDORES FARMACOLÓGICOS.....	24
LÍNEA CELULAR JURKAT	24
SILENCIAMIENTO GÉNICO DE LAS CALPAÍNAS 1, 2 Y 10 EN LAS CÉLULAS JURKAT.....	24

VALIDACIÓN DE LOS <i>KNOCKDOWN</i> DE CALPAÍNA 1, 2 Y 10 POR QPCR Y WESTERN BLOT..	25
<i>Determinación de los niveles de mRNA por PCR en tiempo real (qPCR)</i>	25
<i>Determinación de la abundancia proteica por Western blot</i>	26
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE CALPAÍNAS POR HIDRÓLISIS DEL SUSTRATO CMAC, T-BOC-LEU-MET EN CÉLULAS JURKAT <i>KNOCKDOWN</i> DE CALPAÍNA 1 Y 10	27
CAPTACIÓN DE GLUCOSA EN CÉLULAS JURKAT <i>KNOCKDOWN</i> DE CALPAÍNA 1 Y 10.....	27
ABUNDANCIA DE GLUT1 TOTAL POR WESTERN BLOT EN LAS CÉLULAS JURKAT <i>KNOCKDOWN</i> DE CALPAÍNA 1 Y 10	28
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	29
RESULTADOS	30
LOS INHIBIDORES DE CALPAÍNAS Y DE CATEPSINAS NO ALTERAN LA VIABILIDAD CELULAR	30
LA INHIBICIÓN DE LAS CALPAÍNAS REDUCE LA HIDRÓLISIS DEL SUSTRATO CMAC, T-BOC-LEU-MET	32
LAS CALPAÍNAS PROMUEVEN LA CAPTACIÓN DE GLUCOSA MIENTRAS QUE LAS CATEPSINAS LA INHIBEN	34
LA INHIBICIÓN A CORTO PLAZO DE LAS CALPAÍNAS Y LAS CATEPSINAS NO MODIFICA LA ABUNDANCIA DE GLUT1 EN MEMBRANA	35
LAS CÉLULAS JURKAT SE PUEDEN TRANSDUCIR EXITOSAMENTE CON PARTÍCULAS LENTIVIRALES DESDE UNA MOI DE 2	36
VALIDACIÓN DE LAS CÉLULAS <i>KNOCKDOWN</i> POR QPCR	37
VALIDACIÓN DE LAS CÉLULAS <i>KNOCKDOWN</i> POR WESTERN BLOT	38
LAS CÉLULAS JURKAT NO EXPRESAN CAPN2.....	40
CAPN10 SE ACTIVA DESPUÉS DE UN ESTÍMULO CON GLUCOSA DE FORMA DOSIS-DEPENDIENTE DESDE CONCENTRACIONES BAJAS, MIENTRAS QUE CAPN1 REQUIERE ALTAS CONCENTRACIONES DE GLUCOSA PARA ACTIVARSE.....	41
EL <i>KNOCKDOWN</i> DE CAPN1 Y DE CAPN10 TIENEN EFECTOS CONTRARIOS SOBRE LA CAPTACIÓN DE GLUCOSA	42
LA ABUNDANCIA DE GLUT1 DISMINUYE EN LAS CÉLULAS <i>KNOCKDOWN</i> DE CAPN10.....	44
DISCUSIÓN.....	45
CONCLUSIONES	49
REFERENCIAS	50

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. MIEMBROS DE LA FAMILIA DE LAS CALPAÍNAS CLASIFICADOS POR SU EXPRESIÓN Y ESTRUCTURA	5
FIGURA 2. ESTRUCTURA QUÍMICA DE INHIBIDORES FARMACOLÓGICOS DE CALPAÍNAS.....	9
FIGURA 3. MODELO DE LA PARTICIPACIÓN DE CALPAÍNA-1 EN EL TRÁFICO Y LA TRANSCRIPCIÓN DE LOS GRÁNULOS SECRETORIOS DE INSULINA EN CÉLULAS B PANCREÁTICAS	11
FIGURA 4 . POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO DEL GEN DE LA CALPAÍNA-10 HUMANA.	13
FIGURA 5. LA CAPN10 PROMUEVE LA CAPTACIÓN DE GLUCOSA EN ADIPOCITOS.....	14
FIGURA 6. TRANSPORTE DE GLUCOSA EN LINFOCITOS.....	16
FIGURA 7. FUNDAMENTO DE LA HIDRÓLISIS DEL SUSTRATO FLUOROGÉNICO CMAC, T-BOC-LEU-MET PARA MEDIR ACTIVIDAD DE CALPAÍNAS.....	22
FIGURA 8. REPRESENTACIÓN DE LAS REACCIONES QUÍMICAS DEL ENSAYO DE CAPTACIÓN DE GLUCOSA (“GLUCOSE UPTAKE ASSAY KIT”)	23
FIGURA 9. VECTOR pLKO.1-PURO.....	25
FIGURA 10. EL TRATAMIENTO CON INHIBIDORES DE CALPAÍNAS Y CATEPSINAS NO ALTERA LA VIABILIDAD CELULAR DE LINFOCITOS.	31
FIGURA 11. LA HIDRÓLISIS DEL SUSTRATO CMAC, T-BOC-LEU-MET DISMINUYE POR LA INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA DE LAS CALPAÍNAS Y LAS CATEPSINAS.	33
FIGURA 12. LAS CALPAÍNAS PROMUEVEN LA CAPTACIÓN DE GLUCOSA, MIENTRAS QUE LAS CATEPSINAS B, L Y S LA INHIBEN	34
FIGURA 13. LA INHIBICIÓN A CORTO PLAZO DE LAS CALPAÍNAS Y DE LAS CATEPSINAS NO TIENE EFECTO EN LA TRANSLOCACIÓN DE GLUT1	35
FIGURA 14. LAS CÉLULAS JURKAT SE TRANSDUCEN EXITOSAMENTE DESDE UNA MOI DE 2 .	36
FIGURA 15. VALIDACIÓN DE LOS SILENCIAMIENTOS GÉNICOS DE CAPN1 Y CAPN10 POR qPCR EN LA LÍNEA CELULAR JURKAT.....	37
FIGURA 16. LA ABUNDANCIA DE LA PROTEÍNA CAPN1 DISMINUYE EN CÉLULAS KNOCKDOWN DE CAPN1.	38
FIGURA 17. LA ABUNDANCIA DE LAS ISOFORMAS DE LA PROTEÍNA CAPN10 DISMINUYE EN LAS CÉLULAS KNOCKDOWN DE CALPAÍNA 10.....	39
FIGURA 18. LAS CÉLULAS JURKAT NO EXPRESAN CAPN2	40
FIGURA 19. LA ACTIVIDAD DE LAS CALPAÍNAS DESPUÉS DE ESTÍMULOS CON GLUCOSA EXTRACELULAR DISMINUYE EN LAS CÉLULAS KNOCKDOWN DE CAPN1 Y CAPN10.....	42
FIGURA 20. LA CAPTACIÓN DE 2-DG EN RESPUESTA A ESTÍMULOS CON GLUCOSA EXTRACELULAR SE ALTERA EN LAS CÉLULAS KNOCKDOWN DE CAPN1 Y CAPN10.....	43
FIGURA 21. LA ABUNDANCIA DE LA PROTEÍNA GLUT1 DISMINUYE EN LAS CÉLULAS CAPN10 ^{shRNA}	44

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. INHIBIDORES DE PROTEASAS DE CISTEÍNA CON LOS BLANCOS, K_i REPORTADAS Y CONCENTRACIONES UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO.	21
TABLA 2. CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS Y PARÁMETROS BIOQUÍMICOS DE LOS DONADORES	30

ABREVIATURAS

2-DG	2 desoxi-D-glucosa
AV-PE/7AAD	Anexina V-ficoeritrina/7-amino-actinomicina D
Akt	Proteína cinasa B
AK-275	Bencil N - [(4S) -8-amino-9- (etilamino) -2-metil-5,9-dioxanona-4-il] carbamato
ALLM	N-Acetil-L-leucil-L-leucil-L-metioninal
CA-074	L-3-trans- (Propilcarbamoil) oxirano-2-carbonil) -L-isoleucil-L-prolina
CAPN1, 2 y 10	Calpaína-1, calpaína-2 y calpaína-10
CAPNS1 y CAPNS2	Subunidad reguladora pequeña 1 y 2
CAST	Calpastatina
CATI-1	Ácido 5 - [[metil - [[(1S) -2-oxinilideno-1-fenil-2 - [(fenilmetil) amino] etil] carbamoil] amino] metil] -1,3-benzodioxole-4-carboxílico
C _T	Ciclo umbral
CBSW	Dominio β-sándwich del tipo de calpaína
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CMAC, t-BOC-Leu-Met	7-Amino-4-Clorometil-Cumarin tert-Butoxicarbonil-Leu-Met
CysPc	Dominio de proteasa similar a calpaína
DMSO	Dimetil sulfóxido
DT1	Diabetes tipo 1
DT2	Diabetes tipo 2
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
GLUT	Transportador de glucosa
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HEPES	Ácido 4-(2-hydroxietil)-1-piperazineetanosulfónico
ICA512	Autoantígeno 512 de las células de los islotes
IMC	Índice de masa corporal
KRH	Solución amortiguadora Krebs Ringer Hepes
MIF	Mediana de la intensidad de fluorescencia
MIT	Motivo de interacción y transporte de microtúbulos
MOI	Multiplicidad de infección
mTORc1	Objetivo mecanicista del complejo rapamicina 1
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
PAC	Puromicina N-acetiltransferasa
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Amortiguador fosfato salino
PD151746	Ácido 3-(5-Fluoro-3-indolil)-2-mercapto-(Z)-2-propenoico
PEF(S) y PEF(L)	Dominio penta-mano EF de la subunidad reguladora pequeña y grande

PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinasa
Q1 y Q3	Quartil 1 y 3
qPCR	PCR en tiempo real
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
SNAP-25	Proteína 25 asociada al sinaptosoma
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
SOH	Dominio de homología a SOL
TCR	Receptor de la célula T

RESUMEN

Las calpaínas son una familia de proteasas de cisteína dependientes de calcio. Existen tres calpaínas que participan en la homeostasis de la glucosa: calpaína-1 (CAPN1), calpaína-2 (CAPN2) y calpaína-10 (CAPN10). En linfocitos, GLUT1 es el transportador de glucosa más abundante y la vía PI3K/Akt regula su función, de manera similar a GLUT4 en adipocitos y músculo esquelético. Los linfocitos son células de fácil acceso que podrían ser usadas como indicadores de alteraciones metabólicas en el organismo. El objetivo de este trabajo fue evaluar la participación de las calpaínas en el transporte de la glucosa de células linfoides a través de un modelo de inhibición farmacológica en linfocitos extraídos de sangre periférica y un modelo de células *knockdown* en la línea celular Jurkat de origen linfoide.

Debido a que las calpaínas y las catepsinas comparten similitudes en sus sitios catalíticos y en algunos de sus sustratos, en el primer modelo se utilizaron inhibidores farmacológicos de proteasas de cisteína, de calpaínas y de catepsinas. Con estos inhibidores se demostró la selectividad de las calpaínas en la hidrólisis por el sustrato CMAC, t-BOC-Leu-Met. Los resultados mostraron que las calpaínas son las principales proteasas de cisteína que realizan la hidrólisis del sustrato, y que la captación de 2-DG disminuye en presencia de los inhibidores de calpaínas, sin reducir la abundancia de GLUT1 en la membrana. Estos datos sugieren que las calpaínas pueden regular la captación de 2-DG en linfocitos, sin embargo, con esta estrategia no fue posible identificar a la(s) calpaína(s) responsable(s).

Se establecieron células *knockdown* (KD) con partículas de transducción lentivirales para CAPN1, CAPN2, CAPN10 y un gen control. Las líneas celulares KD se validaron evaluando la expresión del mRNA y la proteína total. De forma interesante se encontró que las células Jurkat no expresaron CAPN2. En las células Control^{shRNA}, la actividad de calpaínas aumentó en presencia de diferentes concentraciones de glucosa extracelular (3.9, 5.6, 11.1 y 15.6 mM) de forma dosis-dependiente de la concentración de glucosa, a partir de la concentración de 5.6 mM de glucosa. Las calpaínas de las células CAPN1^{shRNA} se activaron a partir de la concentración de 11.1 mM de glucosa, y las calpaínas de las células CAPN10^{shRNA} no se activaron a ninguna concentración de glucosa. En el ensayo de captación de glucosa se observó que las células CAPN1^{shRNA} captaron más 2-DG que las células Control^{shRNA}, y que las células CAPN10^{shRNA} captaron menos 2-DG que las células Control^{shRNA}, dato que correlacionó con una reducción en la abundancia total de GLUT1.

Los resultados de este trabajo muestran que la hidrólisis del sustrato CMAC, t-BOC-Leu-Met es un marcador de la actividad de las calpaínas. Además, que la CAPN1 se activa después de un estímulo con glucosa extracelular e inhibe la captación de glucosa. Mientras que CAPN10 es la principal calpaína que se activa después de un estímulo con glucosa extracelular y promueve la captación de glucosa al regular la abundancia de GLUT1.

ABSTRACT

Calpains are a family of calcium-dependent cysteine proteases. There are three calpains involved in glucose homeostasis: calpain-1 (CAPN1), calpain-2 (CAPN2) and calpain-10 (CAPN10). In lymphocytes, GLUT1 is the most abundant glucose transporter and the PI3K / Akt pathway regulates its function, like GLUT4 in adipocytes and skeletal muscle. The lymphocytes are easily accessible cells that could be used as indicators of metabolic alterations in the organism. The aim of this work was to evaluate the participation of calpains in the transport of glucose from lymphoid cells, through a pharmacological inhibition model in lymphocytes extracted from peripheral blood and a model of knockdown cells in the Jurkat cell line.

Because calpains and cathepsins share similarities in their catalytic sites and in some of their substrates, pharmacological inhibitors of cysteine proteases, calpains and cathepsins were used in the first model. With these inhibitors the selectivity of the calpains in the hydrolysis was demonstrated by the CMAC substrate, t-BOC-Leu-Met. The results showed that the calpains are the main cysteine proteases involved in the hydrolysis of the substrate, and that the 2-DG uptake decreases in the presence of the calpain inhibitors, without reducing the abundance of GLUT1 in the membrane. These data suggest that calpains can regulate the 2-DG uptake in lymphocytes; however, with this strategy it was not possible to identify the responsible calpain (s).

Knockdown cells (KD) were established with lentiviral transduction particles for CAPN1, CAPN2, CAPN10 and a control gene. The KD cell lines were validated by evaluating mRNA expression and total protein. Interestingly, it was found that Jurkat cells did not to express CAPN2. In Control^{shRNA} cells, calpain activity increased in the presence of different concentrations of extracellular glucose (3.9, 5.6, 11.1 and 15.6 mM) in a dose-dependent manner of glucose concentration, from the concentration of 5.6 mM glucose. The calpain activity in CAPN1^{shRNA} cells were increased with 11.1 mM of glucose, but in CAPN10^{shRNA} cells were not observed calpain activity at any glucose concentration. CAPN1^{shRNA} cells captured more 2-DG than the Control^{shRNA} cells, whereas CAPN10^{shRNA} cells uptake less 2-DG than the Control^{shRNA} cells, data that correlated with a reduction in the total abundance of GLUT1.

The results of this work show that the hydrolysis of the CMAC substrate, t-BOC-Leu-Met is a marker of calpain activity. In addition, CAPN1 is activated after stimulation with extracellular glucose and inhibits glucose uptake. While CAPN10 is the main calpain that is activated after a stimulus with extracellular glucose and promotes glucose uptake by regulating the abundance of GLUT1.

INTRODUCCIÓN

El sistema proteolítico de las calpaínas está conformado por 15 proteasas de cisteína activadas por Ca^{2+} , dos subunidades reguladoras y un inhibidor endógeno. En 1996, Hanis y colaboradores localizaron una región cromosómica que confiere susceptibilidad para desarrollar diabetes tipo 2 (DT2) en población México-Americana (Hanis *et al.*, 1996). Posteriormente, en el año 2000 se identificaron los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) asociados al riesgo de desarrollar DT2 en el gen de la calpaína-10. Desde entonces, se han realizado diversos estudios enfocados en determinar el papel de las calpaínas en el transporte de la glucosa (Horikawa *et al.*, 2000; Turner, Cassell, & Hitman, 2005a).

A través de la inhibición farmacológica y la manipulación genética de la familia de las calpaínas se ha encontrado que la calpaína-1, la calpaína-2 y la calpaína-10 pueden regular la captación de glucosa y la translocación de los transportadores de glucosa (GLUTs) en células de músculo esquelético y adipocitos (Brown, Yeaman, & Walker, 2007; Otani *et al.*, 2004; Paul, Harmon, Winston, & Patel, 2003). También se ha observado que la actividad de calpaínas y la captación de glucosa es menor en leucocitos de sujetos con DT2 en comparación con sujetos control (Díaz-Villaseñor, Hiriart, Cebrián, Zacarías-Castillo, & Ostrosky-Wegman, 2008; Piątkiewicz, Czech, & Tatoń, 2007). Los linfocitos son células que se obtienen a través de un método poco invasivo, lo que las convierte en un buen modelo celular para estudiar el transporte de la glucosa y sus alteraciones en humanos.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la participación de la calpaína-1, la calpaína-2 y la calpaína-10 en el transporte de la glucosa en células linfoides. Para lograr este objetivo, se plantearon dos modelos: Un modelo de inhibición farmacológica en linfocitos extraídos de sangre periférica de donadores para demostrar la selectividad de las calpaínas por el sustrato CMAC, t-BOC-Leu-Met, y para identificar el efecto de la inhibición general de las calpaínas en el transporte de la glucosa. También se trabajó con un modelo de células *knockdown* en células Jurkat, de origen linfoide, para evaluar el efecto directo de la inhibición de la calpaína-1, la calpaína-2 y la calpaína-10 en el transporte de la glucosa. En ambos modelos se midió el efecto de la inhibición de las calpaínas en la actividad de calpaínas, la

captación de 2-desoxi-D-glucosa (2-DG) y la abundancia de GLUT1, el transportador de glucosa más abundante en células linfoides.

ANTECEDENTES

El sistema proteolítico de las calpaínas

Las calpaínas son proteasas de cisteína no lisosomales caracterizadas por poseer un dominio de proteasa de cisteína (CysPc) homólogo a calpaína-1 o a calpaína-2 humanas (Sorimachi, Hata, & Ono, 2011). Los miembros de esta familia se encuentran en casi todos los eucariotas y en algunas bacterias y se han implicado en numerosos procesos celulares como la señalización celular, la apoptosis y la reordenación de la membrana (Donkor, 2015; Smith *et al.*, 2012). En humanos, se expresan 15 genes de calpaína, denominados *CAPNn* (n=1, 2, 3 y 5-16), cada uno de los cuales genera uno o más transcritos e isoformas a nivel de proteína (CAPNn), constituyendo una superfamilia de más de 50 especies moleculares (Ono, Saido, & Sorimachi, 2016). Además, el sistema proteolítico de las calpaínas incluye dos genes para las subunidades reguladoras (*CAPNS1* y *CAPNS2*), y un gen para la calpastatina (*CAST*), el inhibidor endógeno de las calpaínas convencionales (Ono *et al.*, 2016; Sorimachi *et al.*, 2011).

La calpaína- μ (heterodímero de CAPN1 y CAPNS1) y la calpaína-m (heterodímero de CAPN2 y CAPNS1) son conocidas como calpaínas convencionales. Estas enzimas son activadas *in vitro* por concentraciones micro y milimolares de Ca^{2+} (Miyazaki *et al.*, 2013). Las subunidades catalíticas de CAPN1 y CAPN2 están formadas por diferentes dominios: el N-terminal o dominio I; el dominio catalítico CysPc o dominio II, que está constituido por los subdominios PC1 y PC2 (*protease core 1 y 2*); la región β -sándwich del tipo de calpaína (*calpain-type β -sandwich*, CBSW) o dominio III, y el dominio penta-mano EF o dominio IV (*penta-EF-hand of the large catalytic subunit*, PEF(L)). La subunidad reguladora CAPNS1 se conforma de un dominio penta-mano EF o dominio VI (*penta-EF-hand of the small regulatory subunit*, PEF(S)) y de un grupo rico en residuos de glicina o dominio V (*Gly-rich*, GR) (Ono *et al.*, 2016; Sorimachi *et al.*, 2011).

De acuerdo a los dominios que las conforman, las calpaínas se clasifican en calpaínas

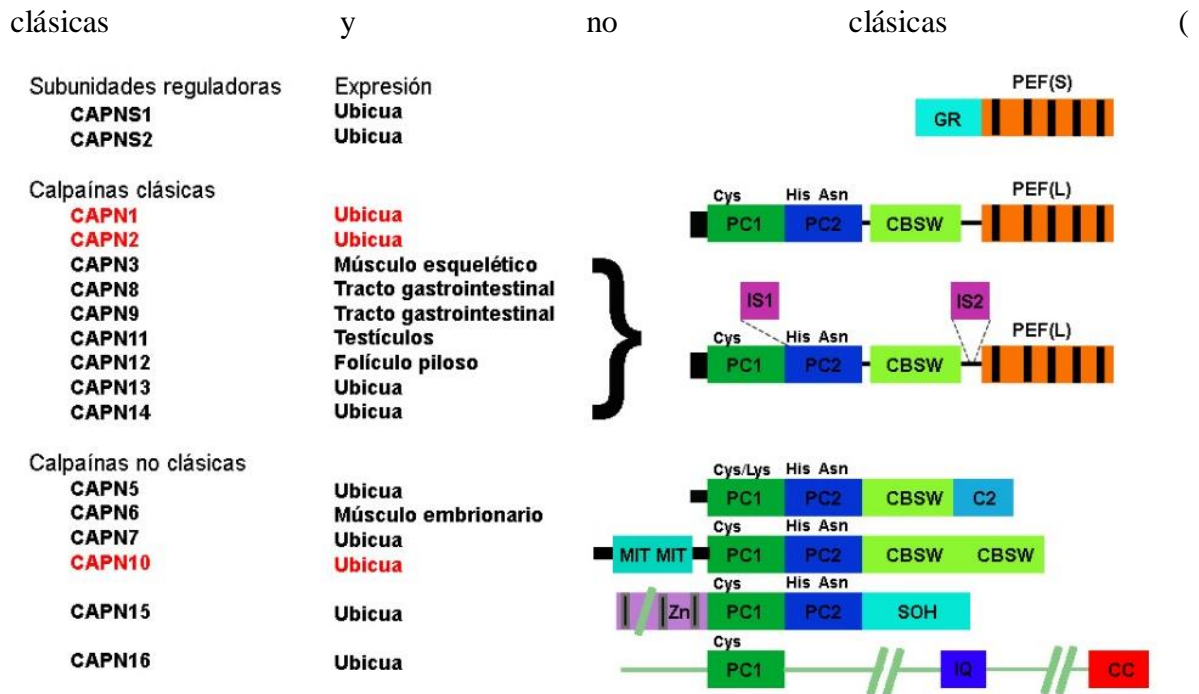


Figura 1). Las calpaínas clásicas son aquellas con dominios similares a los de CAPN1 y CAPN2. Las calpaínas no clásicas no contienen el dominio PEF(L) y pueden o no tener el dominio CBSW, además de poseer otros dominios como: el segundo dominio conservado de la proteína cinasa C (C2); el motivo de interacción y transporte en microtúbulos (*microtubule-interacting-and-transport motif*, MIT), el dominio de dedos de zinc (*Zn-finger*, Zn) y el dominio de homología a SOL (*SOL-homology*, SOH). De los 15 genes que codifican para calpaínas humanas, nueve originan calpaínas clásicas (CAPN1, 2, 3, 8, 9, 11, 12, 13 y 14) y seis genes calpaínas no clásicas (CAPN5, 6, 7, 10, 15 y 16) (Sorimachi *et al.*, 2011). Es importante resaltar, que algunos genes de calpaínas clásicas pueden dar lugar a isoformas no clásicas mediante *splicing* alternativo, por ejemplo, el gen de CAPN3 genera más de 10 isoformas distintas (Ono *et al.*, 2016).

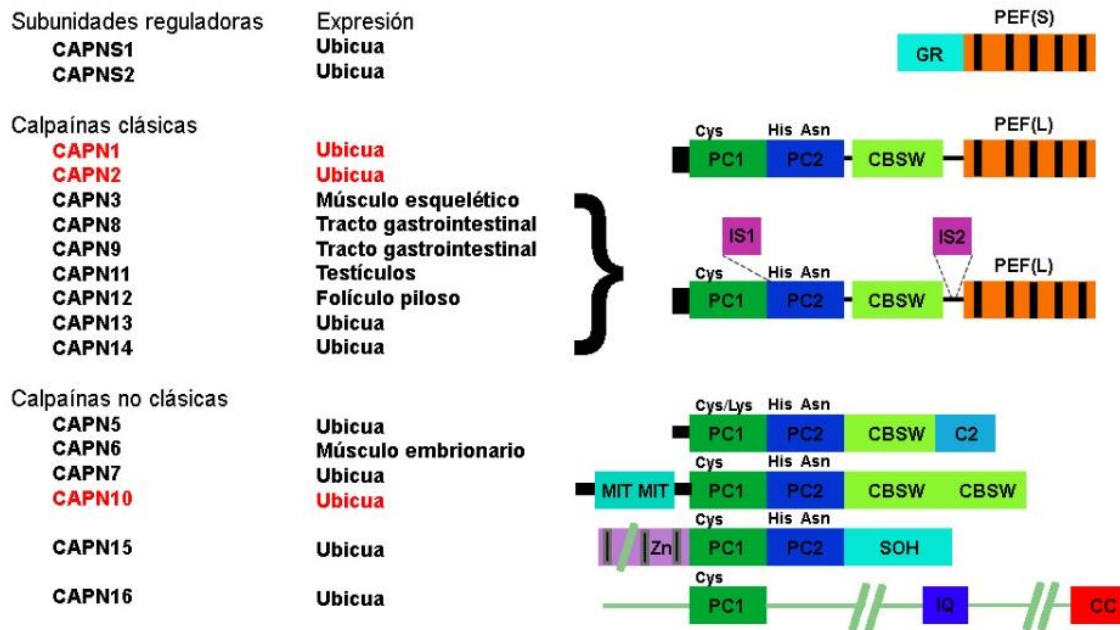


Figura 1. Miembros de la familia de las calpaínas clasificados por su expresión y estructura. Las calpaínas convencionales, calpaína- μ y calpaína-m son heterodímeros de las subunidades catalíticas CAPN1 y CAPN2 y la subunidad reguladora CAPNS1. Con base en su estructura, las calpaínas se clasifican en dos tipos: clásicas, con dominios similares a CAPN1 y CAPN2, y no clásicas. Las siglas en la figura corresponden a la abreviación de los nombres de los dominios, donde: PC1 y PC2 son los subdominios del sitio catalítico, CBSW es la región β -sándwich del tipo de calpaína, PEF(L) y (S) son los dominios penta-mano EF de la subunidad catalítica y reguladora, C2 el segundo dominio conservado de la proteína cinasa C, MIT es el motivo de interacción y transporte en microtúbulos, Zn es el dominio de dedos de Zinc y SOH es el dominio de homología a SOH. Modificada de: (Ono *et al.*, 2016).

Las calpaínas humanas también pueden clasificarse con base en su distribución en órganos y tejidos como ubicuas (CAPN1, 2, 5, 7, 10, 13 y 15) o tejido específicas (CAPN3, 6, 8, 9, 11, 12, 14 y 16) (Sorimachi *et al.*, 2011).

La activación de las calpaínas en la regulación de procesos fisiopatológicos

Las calpaínas pertenecen a la superfamilia de la papaína, y su dominio catalítico tiene alta similitud con las papaínas y las catepsinas. Sin embargo, a diferencia de estas proteasas, el sitio activo de las calpaínas se caracteriza por ser muy estrecho. Lo que permite que las calpaínas realicen la proteólisis de sus sustratos sin degradarlos. Durante este procesamiento proteolítico, las calpaínas retiran dominios en los sustratos, lo cual genera cambios en la estructura y en la actividad de sus sustratos (Ono *et al.*, 2016).

Una diferencia importante de las calpaínas con la papaína y las catepsinas es que el CysPc, o dominio catalítico de las calpaínas está dividido en dos subdominios, llamados PC1 y PC2. Se ha descrito que en ausencia de Ca^{2+} , PC1 y PC2 están separados uno del otro, lo que mantiene a los residuos de aminoácidos de la triada catalítica del CysPc (Cys115 en el PC1 y la His272 y Asn296 en el PC2 de CAPN1) en un estado no funcional (Sorimachi, Mamitsuka, & Ono, 2012). La unión de Ca^{2+} , a motivos de unión de Ca^{2+} inducidos por Ca^{2+} (*calcium induced calcium binding sites* CBS1 y CBS2 en los subdominios PC1 y PC2), genera la rotación y traslación del subdominio PC2, permitiendo que se forme el sitio catalítico y la triada catalítica, sin cambiar drásticamente la estructura general de la calpaína (Ono & Sorimachi, 2012). Además, la unión de Ca^{2+} a los sitios de unión a Ca^{2+} de los dominios PEF de las dos subunidades (CAPN1 y CAPNS1), induce el desplazamiento de la región N-terminal hacia el núcleo de la proteasa, y junto con el dominio CBSW estabilizan el CysPc de la calpaína activa (Campbell & Davies, 2012). Para activarse, las calpaínas convencionales requieren concentraciones muy altas de Ca^{2+} que no se encuentran *in vivo*. No obstante, se ha observado que *in vitro*, los fosfolípidos, componentes principales de la membrana plasmática, reducen la concentración de Ca^{2+} requerida para activar a las calpaínas (Ono & Sorimachi, 2012). Sin embargo, los mecanismos que regulan *in situ* a estas proteasas aún son poco conocidos.

A la fecha se desconoce la manera en que las calpaínas reconocen a sus sustratos (Shinkai-Ouchi *et al.*, 2016). Se ha descrito que, aunque estas enzimas no seleccionan el sitio de corte de forma dependiente de la secuencia de la proteína blanco, siempre cortan en los mismos sitios de una proteína, lo que sugiere que hay especificidad por los sitios de corte (Sorimachi *et al.*, 2012). Estudios a gran escala han mostrado que la longitud de la secuencia en el extremo N-terminal al sitio de corte, así como la estructura secundaria y terciaria del sustrato, juegan un papel importante en la especificidad del sitio de corte por las calpaínas (Shinkai-Ouchi *et al.*, 2016). Algunos de los sustratos conocidos de las calpaínas son: proteínas asociadas al citoesqueleto y la membrana (MAP1 y MAP2, α II-espectrina, β -espectrina, talina y vimentina), enzimas (PKC; PARP), transductores de señales (STAT5 y STAT3) y factores de transcripción (C-Fos; C-jun; NF κ B, e I κ B) (Łopatniuk & Witkowski, 2011).

A través de la proteólisis parcial de sus sustratos, las calpaínas regulan diversos procesos fisiológicos como la remodelación del citoesqueleto, movilidad celular, desarrollo embrionario, transducción de señales, apoptosis, ciclo celular, potenciación a largo plazo de la transmisión sináptica y la expresión génica (Donkor, 2015). Por otra parte, las calpainopatías son enfermedades causadas por un defecto génico en un gen de las calpaínas que originan la pérdida o la ganancia de la función. Ejemplos de estas enfermedades son la distrofia muscular de la cintura y extremidades, por mutaciones en CAPN3, y la vitreoretinopatía inflamatoria autosómica dominante, por mutaciones en CAPN5 (Ono *et al.*, 2016). Las enfermedades en las que las calpaínas contribuyen a su desarrollo o evolución incluyen enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, isquemia, accidente cerebrovascular, hipertensión, enfermedades cardiovasculares, por sobre activación de CAPN1 y CAPN2, cataratas, por sobre activación de CAPN1, CAPN2 e isoformas de CAPN3, úlcera gástrica, por disminución en la actividad de CAPN8 y CAPN9, algunos tipos de cáncer, por desregulación de varias calpaínas y diabetes tipo 2 (DT2), por desregulación de CAPN1, CAPN2 y CAPN10 (Ono *et al.*, 2016; Zatz & Starling, 2005).

Herramientas para el estudio de las calpaínas

Aunque es claro que las calpaínas tienen un papel importante en procesos fisiopatológicos, se desconocen los mecanismos precisos que regulan la actividad de las calpaínas dentro de las células. Como se describió en el capítulo anterior, las reglas que rigen la selectividad de las calpaínas por sus sustratos no son del todo claras, y existen pocas herramientas específicas y selectivas que modulen la actividad de estas enzimas (Ono *et al.*, 2016).

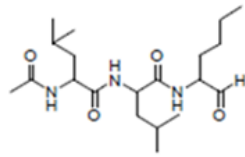
Una de las estrategias utilizadas para evaluar la función de las calpaínas ha sido el uso de inhibidores endógenos y farmacológicos. El inhibidor endógeno de las calpaínas es la calpastatina, una proteína que inhibe selectivamente a las calpaínas μ y m con eficiencias similares; con una IC_{50} de 0.50-1.57 nM y 0.83-1.34 nM, respectivamente. Su estructura está conformada por un dominio N-terminal no inhibitorio (dominio L) y cuatro repeticiones del dominio inhibitorio (dominios I-IV). Cada uno de los dominios es capaz de inhibir a una molécula de calpaína, a través de la interacción con el dominio CysPc, con el dominio CBSW y con los dominios PEF(L) y PEF (S). Diversos estudios que han tratado de dilucidar la

función de las calpaínas convencionales, han empleado la sobreexpresión exógena de esta proteína (Ono *et al.*, 2016; Pietsch, Chua, & Abell, 2010; Sorimachi *et al.*, 2011).

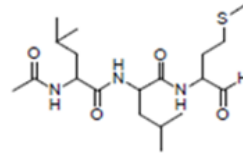
Además, se han desarrollado diversos inhibidores farmacológicos de las calpaínas con diferente especificidad. Estos inhibidores se clasifican en: inhibidores del sitio activo, reversibles o irreversibles, y en inhibidores alostéricos que actúan sobre dominios diferentes al CysPc (**Figura 2**) (Donkor, 2011). Los inhibidores irreversibles son aquellos que reaccionan de manera covalente y alquilan, acilan, fosforilan o sulfonilan la cisteína del sitio activo, inactivando permanentemente a la enzima, tales como el E-64 y el E-64c y el E-64d.

Los inhibidores reversibles son compuestos que forman un complejo no covalente con la enzima y pueden unirse al sitio activo con o sin sustrato (inhibidores competitivos y no competitivos); como la leupeptina, calpeptina, MDL-28170, SJ-6017, ALLN, ALLM, AK-275 y AK-295. Los inhibidores alostéricos son aquellos que no están dirigidos contra el sitio activo, como los inhibidores PD150606 y PD151746, que interactúan con el dominio PEF(S) o dominio VI de unión a Ca^{2+} (Carragher, 2006; Siklos, BenAissa, & Thatcher, 2015).

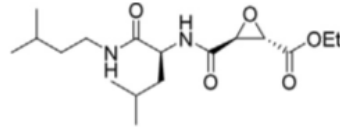
Inhibidores del CysPc



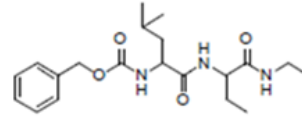
ALLN



ALLM

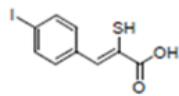


E-64d

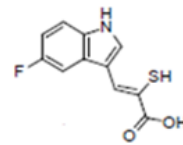


AK-275

Inhibidores Alostéricos



PD150606



PD151746

Figura 2. Estructura química de inhibidores farmacológicos de calpaínas. Los inhibidores de calpaínas se clasifican en inhibidores reversibles (ALLN, ALLM y AK-275) e irreversibles (E-64d) del sitio catalítico, e inhibidores alostéricos (PD150606 y PD151746). Modificada de: Kumar, Choonara, & Pillay, 2014; Siklos, BenAissa, & Thatcher, 2015.

La mayoría de los inhibidores de las calpaínas están dirigidos contra el sitio catalítico, el cual posee una gran similitud con el de las papaínas y catepsinas. Lo que provoca que los inhibidores carezcan de especificidad por las calpaínas, y tengan afinidad por otras proteasas de cisteína (Donkor, 2015). Las únicas estrategias disponibles para estudiar de forma precisa el papel de las calpaínas en sistemas biológicos es a través del uso de herramientas genéticas (modelos *knockout*, *knock-in* y de sobre-expresión) y moleculares (siRNAs, shRNAs e inhibidores selectivos de tejido) (Ono *et al.*, 2016).

Las CAPN1 y CAPN2 participan en la secreción de insulina y en el transporte de glucosa

De todos los miembros de la familia de las calpaínas, las calpaínas convencionales CAPN1 y CAPN2 son las isoformas más estudiadas. Tienen una especificidad de sustrato casi idéntica con más de 100 sustratos descubiertos, y su expresión ubicua en mamíferos sugiere que podrían estar implicadas en procesos esenciales y regulatorios (Miller, Adams, Hallett, & Allemann, 2013; Shanmuga Sundaram, Mohana Rao, Meena, & Anandaraj, 2006).

Los ratones *knockout* de *CAPN1* son animales sanos y fértiles, sin embargo, presentan alteraciones en la agregación plaquetaria y en la retracción del coágulo. Los ratones *knockout* de *CAPN2* mueren en la etapa de desarrollo previa a la implantación, entre las etapas de mórula y blastocito. Esto sugiere, que la ausencia de CAPN1 puede ser parcialmente compensada por CAPN2, pero no en el caso contrario (Dutt *et al.*, 2006).

La CAPN1 se ha implicado en la vía de síntesis y secreción de insulina en las células β pancreáticas (**Figura 3**). El autoantígeno 512 de las células de los islotes (ICA512-TMF); es un miembro de la familia de receptores fosfatasa de tirosina que carece de actividad catalítica, y que está enriquecido en las membranas de los gránulos secretores de insulina. En ausencia de altas concentraciones de glucosa, ICA512-TMF se une a la β 2-sintrofina, anclando los gránulos de insulina al citoesqueleto. Después de un estímulo con glucosa, la fosforilación de la β -sintrofina induce su disociación de ICA512-TMF, aumentando la movilidad de los gránulos (Ort *et al.*, 2001). En la membrana plasmática CAPN1 escinde a ICA512-TMF, y genera un fragmento citoplasmático llamado ICA512-CCF. Este fragmento promueve la separación del complejo β 2-sintrofina/ ICA512-TMF, lo que regula el recambio de los gránulos. El ICA512-CCF también es capaz de translocarse al núcleo y promover la transcripción de los genes que participan en la formación de los gránulos de insulina a través de su interacción con las proteínas STAT (Trajkovski *et al.*, 2004, 2008).

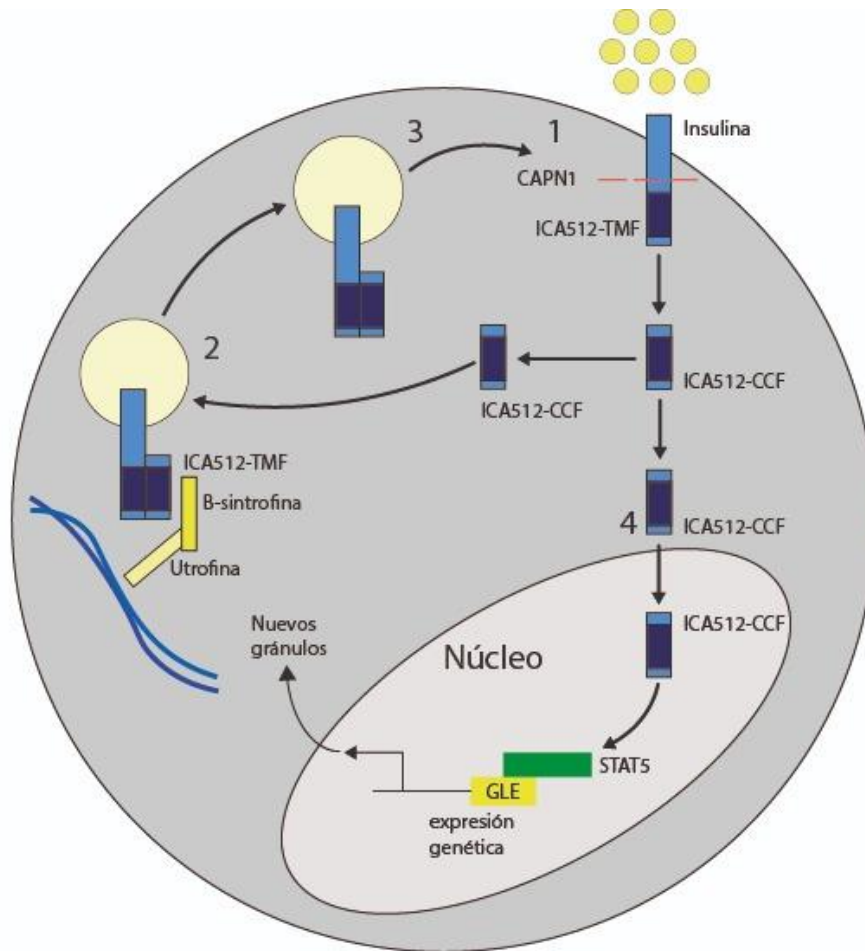


Figura 3. Modelo de la participación de calpaína-1 en el tráfico y la transcripción de los gránulos secretorios de insulina en células β pancreáticas. Calpaína-1 escinde a ICA512-TMF (1). ICA-CCF, el fragmento resultante, interrumpe el complejo ICA512-TMF/β-sintrofina (2), y provoca el desplazamiento de los gránulos de insulina hacia la membrana (3). El agotamiento progresivo de los gránulos aumenta la posibilidad de que las moléculas ICA512-CCF alcancen el núcleo y aumenten la transcripción de los genes que participan en la formación de los gránulos (4). Modificada de: Trajkovski *et al.*, 2008.

Se ha descrito, que al sobre-expresar a calpastatina de manera específica en el músculo esquelético de ratones, se induce un aumento en la abundancia proteica de GLUT4 y GLUT1, aunque no se genera un incremento en la captación de glucosa. También disminuyen los niveles de la proteína cinasa B (Akt), una proteína cinasa importante en la translocación de las vesículas de GLUT4 a la membrana celular. Además, se demostró que la CAPN2 corta a GLUT4 en su posición C-terminal *in vitro*, lo que sugiere que las calpaínas son capaces de modular la estabilidad de los transportadores de glucosa y su translocación (Branca, 2004; Mackenzie & Elliott, 2014; Otani *et al.*, 2004).

En adipocitos, la sobre-expresión de calpastatina promueve la diferenciación de pre-adipocitos mesenquimatosos de ratón (ST-13) y disminuye la captación de glucosa estimulada por insulina (Yajima *et al.*, 2006); lo que demuestra que la CAPN1 y CAPN2 regulan la homeostasis de la glucosa en diversos tejidos.

La CAPN10 en la diabetes y en la homeostasis de la glucosa

La CAPN10 pertenece al grupo de las calpaínas no clásicas porque carece del dominio PEF(L), y en su lugar posee una segunda repetición del dominio CBSW (Flores-Martínez *et al.*, 2015). Si bien se ha descrito que el gen de CAPN10 puede generar hasta ocho isoformas diferentes mediante *splicing* alternativo (CAPN10a-h), se ha observado que varios de estos mRNA se degradan sin ser traducidos a proteína (Green *et al.*, 2003; Horikawa *et al.*, 2000). De las ocho isoformas generadas, la CAPN10a es la más abundante en la mayoría de los tejidos en los que se ha estudiado, y codifica para una proteína de 75 kDa (Horikawa *et al.*, 2000; Pánico, Salazar, Burns, & Ostrosky-Wegman, 2014). La CAPN10 se expresa en casi todos los tejidos humanos adultos y fetales, con excepción de la porción exocrina del páncreas y las neuronas en el sistema nervioso central (Horikawa *et al.*, 2000; Yan-yan Li *et al.*, 2015, p.; Ma *et al.*, 2001; Pánico *et al.*, 2014; Yan *et al.*, 2014).

Los SNPs intrónicos de la CAPN10, SNP-43 (G>A), -63 (C>T) y la inserción/delección de 32 pb, (InDel-19; **Figura 4**) conforman el haplotipo de riesgo que aumenta hasta 2.9 veces la probabilidad de desarrollar DT2 (Flores-Martínez *et al.*, 2015, p.; Horikawa *et al.*, 2000; Senemar, Edraki, & Toosi, 2016). Si bien estudios individuales han mostrado ciertas controversias para replicar la asociación de estos polimorfismos con el riesgo a desarrollar DT2, existen metaánalisis que han encontrado una fuerte asociación del SNP-43 y del SNP-44 con un incremento en el riesgo de padecer DT2 del 19 y del 17% (Pánico *et al.*, 2014). Sin embargo, aún no se conocen los mecanismos a través de los cuales estos polimorfismos pudieran incrementar el riesgo a desarrollar DT2.

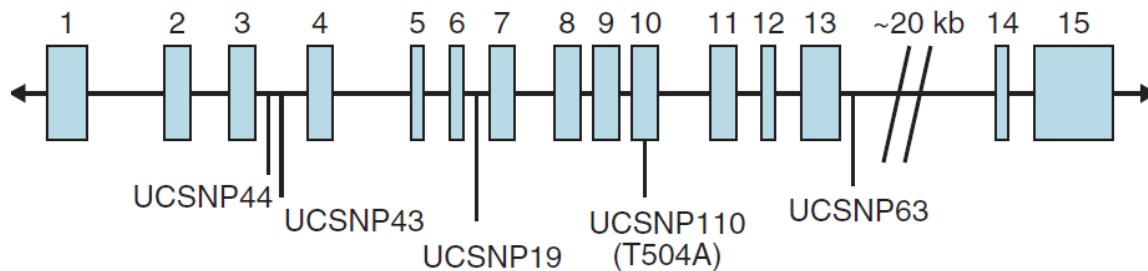


Figura 4 . Polimorfismos de un solo nucleótido del gen de la Calpaína-10 humana. El haplotipo 112/121, conformado por los SNP-43 y 63, y el InDel-19, está asociado con el riesgo de desarrollar DT2 en población México-Americana. Modificada de: Turner, Cassell, & Hitman, 2005b.

A nivel molecular y celular, se ha descrito que la estimulación aguda (60 minutos) o crónica (3.5 a 10.5 días) con glucosa a una concentración de 15 o 28 mM induce un aumento en la abundancia a nivel de proteína de las isoformas de 54 y 64 kDa de CAPN10 en la línea celular de insulinoma INS-1. Se ha descrito, que la isoforma de 54 kDa de CAPN10 interactúa con los gránulos secretores de insulina, donde escinde la proteína SNAP-25 y favorece la secreción de insulina inducida con un coctel de secretagogos (Marshall *et al.*, 2005; Turner *et al.*, 2007).

También se ha implicado a CAPN10 con el transporte de la glucosa en adipocitos y células de músculo esquelético. El *knockdown* de CAPN10 en adipocitos 3T3-L1 disminuye la captación de glucosa estimulada por insulina, por alteraciones en la reorganización de los filamentos de actina y por una menor translocación del transportador de glucosa GLUT4, a la membrana plasmática (**Figura 5**) (Paul *et al.*, 2003). En miotubos humanos, el *knockdown* de CAPN10 reduce la captación de glucosa estimulada por insulina, pero no altera la fosforilación de Akt ni los niveles de expresión de GLUT1 o GLUT4 (Brown *et al.*, 2007). Sin embargo, aún se desconocen los blancos moleculares específicos y los mecanismos que regula CAPN10.

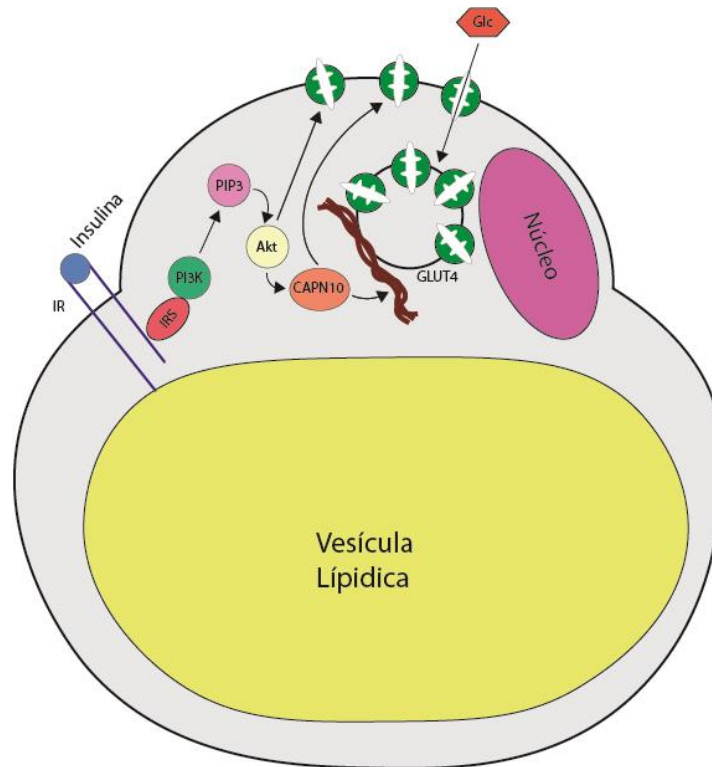


Figura 5. La CAPN10 promueve la captación de glucosa en adipocitos. CAPN10 promueve la organización de los filamentos de actina, la translocación de las vesículas de GLUT4 a la membrana plasmática y la captación de glucosa en adipocitos estimulados con insulina. Modificada de: Pánico *et al.*, 2014.

Se ha descrito que la CAPN10 también participa en el recambio de proteínas mitocondriales y en la homeostasis mitocondrial de células de la nefrona. En células renales de conejos, el *knockdown* de CAPN10 induce daño renal. Por otra parte, la hiperglucemia crónica de células renales provoca una disminución en la abundancia de CAPN10 y muerte celular por apoptosis (Covington & Schnellmann, 2012). En las ratas *Otsuka Long-Evans Tokushima fatty* (OLETF), un modelo animal que desarrolla espontáneamente a la semana 18 un fenotipo similar a la DT2, la expresión de CAPN10 en hígado, adipocitos y leucocitos disminuye aún antes de que los animales desarrollen la enfermedad. Esto sugiere, que las alteraciones de CAPN10 observadas en leucocitos podrían reflejar las alteraciones en los órganos que participan en la homeostasis (Covington & Schnellmann, 2012; Sato, Kuwajima, Kamiya, & Harashima, 2003).

El linfocito como modelo de estudio en el transporte de la glucosa.

Los linfocitos son células mononucleares que forman parte de la respuesta inmune adaptativa. Son los agranulocitos más comunes y representan aproximadamente el 30% de los leucocitos sanguíneos totales (Gartner & Hiatt, 2002; MacIver *et al.*, 2008). Los linfocitos se clasifican en linfocitos B (CD19) y T (CD3, CD4 y CD8) por sus marcadores de superficie y en linfocitos quiescentes (G₀) y en proliferación (S) de acuerdo a la etapa del ciclo celular en la que se encuentren (Ross & Wojciech, 2012; Yusuf & Fruman, 2003).

Los linfocitos en estado quiescente utilizan poca energía, que obtienen principalmente de la fosforilación oxidativa de la glucosa (**Figura 6A**) (MacIver *et al.*, 2008). En todos los tipos celulares la captación de glucosa es mediada por la familia de los transportadores de glucosa (GLUT). Los GLUT conforman una familia de 13 transportadores de glucosa presentes en la membrana plasmática, de los cuales los linfocitos expresan GLUT1, 3, 6 y 8 (Macintyre *et al.*, 2014).

A diferencia de músculo o hígado, los linfocitos no tienen reservas internas de glucógeno y son dependientes de la glucosa extracelular que entra a las células a través de GLUT1 (Cammann *et al.*, 2016). GLUT1 es el transportador de glucosa más abundante en linfocitos quiescentes y en proliferación, y la vía de PI3K/Akt/mTORc1 promueve su tráfico y actividad (Jacobs *et al.*, 2008; Macintyre *et al.*, 2014). En ausencia de señales extracelulares que activen la vía PI3K/Akt/mTORc1, como citoquinas o factores de crecimiento (IL-2, IL-4 e IL-7), GLUT1 permanece intracelular y puede degradarse en los lisosomas y restringir la captación de glucosa (MacIver *et al.*, 2008).

La activación de los linfocitos T por la estimulación conjunta del receptor de célula T (TCR), y las inmunoglobulinas de superficie CD3 y CD28 inducen un incremento de más de 10 veces en los niveles de proteína de GLUT1 y en la captación de glucosa (Wofford, Wieman, Jacobs, Zhao, & Rathmell, 2008). Esto permite que los linfocitos aumenten la glucólisis aeróbica y produzcan ATP y lactato, así como precursores para la síntesis de nucleótidos, aminoácidos y lípidos (**Figura 6B**) (Donnelly & Finlay, 2015; Jacobs *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2014; Macintyre *et al.*, 2014; MacIver *et al.*, 2008). Sin embargo, en

ausencia de glucosa las células no proliferan y los miembros de la familia Bcl-2 se activan promoviendo la muerte celular (MacIver *et al.*, 2008).

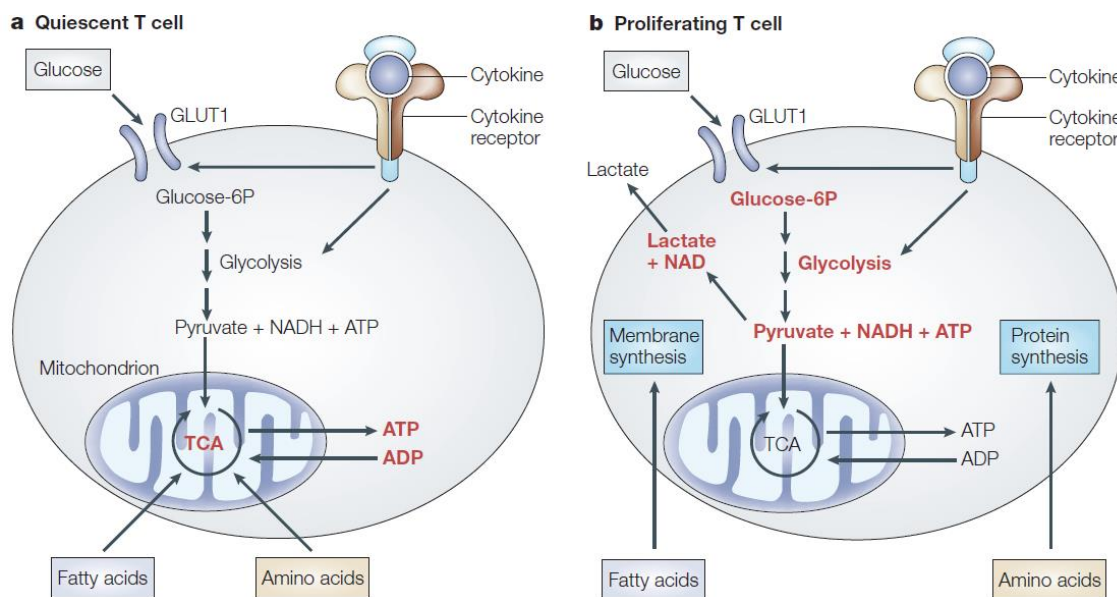


Figura 6. Transporte de glucosa en linfocitos. A) En linfocitos quiescentes, algunas citocinas como IL-7 o IL-4 incrementan la abundancia de GLUT1 en la superficie celular y promueven la fosforilación oxidativa. B) En linfocitos en proliferación, la estimulación por mitógeno, IL-2 o CD3 y CD28 aumenta la abundancia de GLUT1 en la superficie celular y promueve la glicólisis aerobia, y la síntesis de proteínas. Modificada de: Fox, Hammerman, & Thompson, 2005.

En linfocitos, el transporte de la glucosa regula la viabilidad, activación, proliferación y producción de citocinas, y los defectos en el transporte de la glucosa producen apoptosis celular y un deterioro de la respuesta inmune, lo que origina o promueve diferentes enfermedades (Fox *et al.*, 2005). Algunos estudios señalan que, individuos con DT2 tienen una menor proporción de neutrófilos/linfocitos, lo que se correlaciona con altos niveles de hemoglobina glicada, glucosa en ayuno y de resistencia a la insulina (HOMA-IR) (Shiny *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2017).

En un estudio *in vitro* se observó que el tratamiento con altas concentraciones de glucosa, (30 mM) disminuye la captación de glucosa, como consecuencia de la reducción en la abundancia de GLUT1 en membrana plasmática de linfocitos de donadores sanos (Oleszczak, Szablewski, & Pliszka, 2012). Además, la inactivación con anticuerpos de

GLUT1 también disminuye significativamente la internalización de glucosa en timocitos de ratas jóvenes (Carbó & Guarner, 2010).

Durante el estado diabético se promueve el estrés oxidativo, lo que conduce a la producción de citocinas, moléculas de adhesión (ICAM y PECAM), prostaglandinas, ácido araquidónico, entre otros, que activan varias células, entre ellas los linfocitos T (Stentz & Kitabchi, 2003). En linfocitos de pacientes con DT2 se encontró la expresión del receptor de insulina, IRS-1, IRS-2, IL-2, IL-2R e IL-8 disminuida, mientras que la expresión de algunas citocinas proinflamatorias, como IFN- γ , TNF α , IL-1 β , IL-6 e IL-17 está aumentada (Maciolek, Alex Pasternak, & Wilson, 2014; Nikolajczyk, Jagannathan-Bogdan, Shin, & Gyurko, 2011; Takeda & Wakabayashi, 2012).

Por otra parte, se ha observado, que los linfocitos de pacientes con DT2 captan menos glucosa en comparación con los linfocitos de donadores control (Piątkiewicz *et al.*, 2007). En un estudio piloto de nuestro grupo de trabajo, se encontró que la actividad de calpaínas en linfocitos después de un estímulo con altas concentraciones de glucosa es menor en donadores con DT2 con respecto a donadores control (Díaz-Villaseñor *et al.*, 2008).

A diferencia de otros tejidos que se obtienen de biopsias, los linfocitos se extraen de sangre periférica con un método poco invasivo, lo que los convierte en una gran alternativa para el estudio del transporte de la glucosa en células humanas.

JUSTIFICACIÓN

Los linfocitos son células sanguíneas que utilizan glucosa como principal fuente de energía, y que comparten vías de señalización con músculo esquelético y adipocitos para regular la captación de glucosa. Trabajos previos *in vivo* muestran que la sobreexpresión de calpastatina, el inhibidor endógeno de las calpaínas induce un aumento en los niveles proteicos de GLUT1 y GLUT4, pero no incrementa la captación de glucosa en músculo esquelético de ratones.

Por otra parte, en nuestro grupo se ha mostrado que la actividad de las calpaínas en leucocitos de pacientes con DT2, es menor en comparación a la de individuos control. En ratas OLETF, un modelo animal que desarrolla espontáneamente características clínicas y patológicas de la DT2, se ha encontrado que la expresión de calpaína-10 está disminuida en hígado, adipocitos y leucocitos aún antes de que se desarrolle la enfermedad. Además, en leucocitos de sujetos con diabetes se ha observado que la captación de glucosa es menor que la de leucocitos de donadores control.

Los linfocitos son células que se obtienen a través de un método poco invasivo, lo que los convierte en un buen modelo celular para estudiar el transporte de la glucosa y sus alteraciones en el humano. Sin embargo, aún se desconocen muchos aspectos de las funciones del sistema de las calpaínas y de la regulación de los transportadores de glucosa en estas células. Por este motivo, este trabajo se enfocará en estudiar el efecto de la inhibición de las calpaínas en la captación de la glucosa y en los niveles de GLUT1, el transportador de glucosa más abundante e importante en células linfoides.

HIPÓTESIS

La abundancia de GLUT1 y la captación de glucosa aumentarán en respuesta a la activación de la calpaína-1, calpaína-2 y calpaína-10, en células linfoides.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la participación de la calpaína-1, calpaína-2 y calpaína-10 en el transporte de la glucosa en células linfoides.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Inhibición farmacológica de la actividad de calpaínas y catepsinas.

- œ Determinar que el sustrato CMAC, t-BOC-Leu-Met es un blanco específico de la actividad proteolítica de las calpaínas en linfocitos primarios.
- œ Establecer la(s) concentraciones no citotóxicas de los inhibidores de calpaínas y catepsinas que disminuyan la hidrólisis del sustrato fluorogénico en linfocitos primarios.
- œ Evaluar el efecto de la inhibición farmacológica de las calpaínas en la captación de glucosa y la abundancia del transportador de glucosa GLUT1 en membrana plasmática de linfocitos primarios.

Células *knockdown*:

- œ Generar y validar células *knockdown* de la calpaína-1, calpaína-2 y calpaína-10 en la línea celular de origen linfoide Jurkat.
- œ Evaluar los efectos de los silenciamientos génicos de la calpaína-1, calpaína-2 y calpaína-10 en la actividad de calpaínas, la captación de glucosa y la abundancia total de GLUT1.

MATERIAL Y MÉTODOS

LINFOCITOS EXTRAIDOS DE SANGRE PERIFÉRICA

Obtención de sangre periférica de donadores y determinación de parámetros bioquímicos; separación y siembra de linfocitos

En tubos BD Vacutainer® con heparina se extrajeron 18 ml de sangre periférica por punción venosa de donadores de ambos sexos con ocho a diez horas de ayuno. Los criterios de inclusión fueron tener entre 20 y 40 años, índice de masa corporal (IMC) menor o igual a 25 y tener concentraciones de glucosa, triglicéridos, colesterol total y HDL en suero dentro de los rangos normales de acuerdo a los valores de referencia de la Asociación Americana del Corazón (**Tabla 2**) (Grundy Scott M. *et al.*, 2018). Los criterios de exclusión fueron padecer enfermedades crónico-degenerativas o estar bajo algún tratamiento médico. Los parámetros bioquímicos se determinaron con 5 ml de sangre en un tubo BD Vacutainer® con EDTA. Se empleó un fotómetro de reflexión automático Reflotron® Plus (Roche). Para obtener las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se realizó una separación por gradiente de densidad de la sangre extraída con Ficoll (Hypaque, Sigma™). Las PBMCs se lavaron dos veces con PBS y se contaron exclusivamente los linfocitos mediante un gráfico de tamaño contra granularidad (FSC vs SSC) en un citómetro de flujo Attune (Applied Biosystems). Las células se sembraron a una densidad de 1×10^6 linfocitos/ml en medio RPMI-1640 (ThermoFisher), suplementado con 3.9 mM de glucosa. Las células se incubaron por dos horas a 37°C en una incubadora humidificada con 5% de CO₂.

Tratamiento con inhibidores farmacológicos de calpaínas o de catepsinas

Después de las dos horas de incubación se tomaron 0.12×10^6 linfocitos por condición. Las células se lavaron con PBS y se incubaron a 37°C por 10 minutos con el amortiguador Krebs Ringer HEPES (KRH; NaCl 115 mM, KCl 5 mM, KH₂PO₄ 1 mM, CaCl₂ 2 mM, MgSO₄ 1.2 mM, HEPES 25 mM), más glucosa a 3.9 mM, DMSO, o los inhibidores de proteasas de cisteína (ALLM; Sigma-Aldrich), de calpaínas (AK-275; Santa Cruz Biotechnology y PD151746; Sigma-Aldrich), o de catepsinas (CATI-1; Merck). El inhibidor impermeable de catepsina B (CA-074; Sigma-Aldrich) se incubó con los linfocitos por 12 horas en medio RPMI-1640 (ThermoFisher) con 5.6 mM de glucosa. Las concentraciones de cada uno de los

inhibidores se establecieron con base en una escala logarítmica, desde la constante de inhibición (K_i) para cada inhibidor reportada en la literatura hasta concentraciones saturantes (*Tabla 1*).

Tabla 1. Inhibidores de proteasas de cisteína con los blancos, K_i reportadas y concentraciones utilizadas en este trabajo.

Inhibidor	Blanco reportado	Ki Calpaína-1	Ki Calpaína-2	Ki Catepsina B	Concentraciones usadas
ALLM	Proteasas de cisteína	120 nM	230 nM	100 nM	0.1, 1, 10 y 100 μ M
AK-275	Calpaínas	250 nM	210 nM	2.4 μ M	0.2, 2, 20 y 200 μ M
PD151746	Calpaínas	260 nM	5.33 μ M	>200 μ M	0.2, 2, 20 y 200 μ M

Inhibidor	Blanco reportado	Ki Catepsina B	Ki Catepsina L	Ki Catepsina S	Concentraciones usadas
CATI-1	Catepsinas B, L y S	16 μ M	82 nM	850 nM	0.1, 1, 10 y 100 μ M
CA-074	Catepsina B	2-5 nM	40-200 μ M	No Aplica	1, 10 y 100 μ M

Análisis de la viabilidad en linfocitos tratados con inhibidores farmacológicos

Para evaluar la viabilidad celular después de los tratamientos con inhibidores, las células se lavaron e incubaron en hielo y en oscuridad por 20 minutos en Guava Nexin buffer (Guava Technologies) con anexina V-Ficoeritrina¹ (AV-PE; BD Pharmigen; 1:100) y 7-aminoactinomicina D² (7AAD; BD Pharmigen; 30 μ L/mL). Se leyeron 10,000 células por condición utilizando los canales BL2 y BL3 del Citómetro Attune Azul-Violeta (Applied Biosystems). Se consideraron como células vivas aquellas que fueron AV-PE negativas y 7AAD negativas.

¹ Leptina de unión a fosfatidilserina

² Intercalador fluorescente de las secuencias Guanina-Citosina

Determinación de la actividad de calpaínas por hidrólisis del sustrato CMAC, t-BOC-Leu-Met en linfocitos tratados con inhibidores farmacológicos

Después del tratamiento de 10 minutos con los inhibidores, las células se incubaron por 25 minutos a 37°C con KRH con 3.9 mM de glucosa, DMSO, los distintos inhibidores y el sustrato fluorogénico CMAC, t-BOC-Leu-Met (10 µM, Molecular Probes). En la **Figura 7** se muestra el fundamento de la reacción. Posteriormente, los linfocitos se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS y se evaluó la fluorescencia de 20,000 células por muestra en el canal VL1 del Citómetro Attune Azul-Violeta (Applied Biosystems) para determinar la hidrólisis del sustrato.

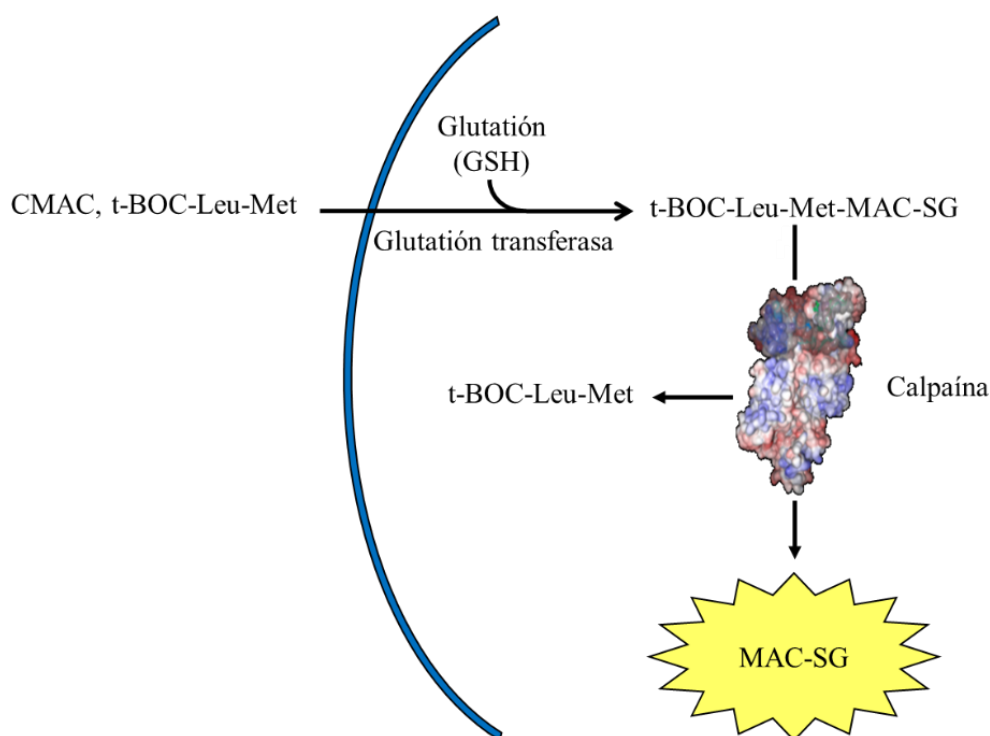


Figura 7. Fundamento de la hidrólisis del sustrato fluorogénico CMAC, t-BOC-Leu-Met para medir actividad de calpaínas. El sustrato fluorogénico CMAC, t-BOC-Leu-Met es permeable y en el interior de la célula se conjuga con glutación (GSH) para formar un compuesto que se hidroliza por acción de las calpaínas, generando el complejo CMAC-GS, capaz de emitir fluorescencia. Traducida de: Rosser & Gores, 2000.

Captación de glucosa por método colorimétrico en linfocitos tratados con inhibidores farmacológicos

Para realizar los ensayos de captación de glucosa y abundancia de GLUT1, de cada inhibidor se eligió la concentración a la cual hubo una mayor disminución en la hidrólisis del sustrato. Al terminar las dos horas de incubación, se tomaron 0.5×10^6 linfocitos por condición. Las células se lavaron con PBS y se incubaron por 60 minutos a 37°C con el amortiguador KRH-3.9 mM de glucosa y con los inhibidores (ALLM, 100 μM ; CATI-1, 100 μM ; AK-275, 200 μM y PD151746, 200 μM). Posteriormente se agregó 2-desoxi-D-glucosa (2-DG; concentración final=1 mM) y se incubaron por 20 minutos. La captación de 2-DG se midió mediante un sistema colorimétrico (“*Glucose Uptake Assay Kit*”, ab136955, Abcam) siguiendo las especificaciones del fabricante. Este sistema, determina las concentraciones de 2-desoxi-D-glucosa 6-fosfato (2-DG6P) mediante una serie de reacciones enzimáticas que producen una reacción colorimétrica (**Figura 8**). Las muestras se midieron cada 3 minutos a 37°C en un lector de absorbancia para microplacas VersaMax (Molecular Devices) midiendo la absorbancia con longitud de onda de 405 nm.

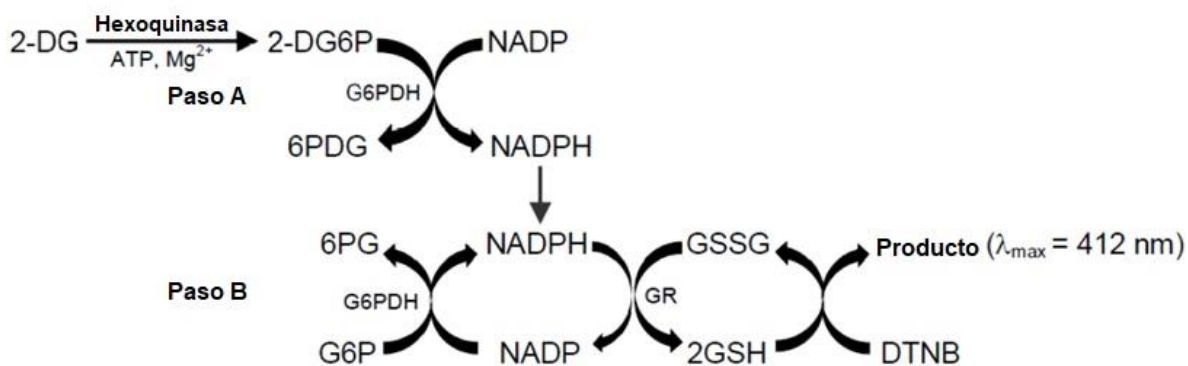


Figura 8. Representación de las reacciones químicas del ensayo de captación de glucosa (“Glucose Uptake Assay Kit”). El kit de análisis de captación utiliza el análogo de la glucosa 2-DG. La 2-DG entra a las células a través de los transportadores de glucosa y es metabolizado a 2-DG6P. El 2-DG6P acumulado se oxida para generar NADPH, en una reacción de oxidación del sustrato que se detecta al medir la densidad óptica a una longitud de 412 nm. Traducida de: “Glucose Uptake Assay Kit (Colorimetric) (ab136955) | Abcam”

Abundancia de GLUT1 en la membrana plasmática por inmunotinción en linfocitos tratados con inhibidores farmacológicos

Después del ayuno, se tomaron 0.25×10^6 linfocitos por condición, se lavaron con PBS y se incubaron por 60 minutos a 37°C con KRH-3.9 mM de glucosa y con los diferentes inhibidores (CATI-1, $100 \mu\text{M}$ y PD151746, $200 \mu\text{M}$). A continuación, las células se lavaron y colocaron en hielo por 30 minutos con el anticuerpo primario de ratón contra el dominio extracelular de GLUT1 (LS-C129284; LifeSpan Biosciences) diluido 1:100 en PBS con 3% de albúmina de suero bovino (BSA). Posteriormente, las células se lavaron con PBS frío y se dejaron en hielo y en oscuridad por 15 minutos con el anticuerpo secundario de cabra anti-ratón IgG (H+L), Alexa Fluor 488 (Invitrogen; 1:1000 en PBS-BSA 3%). Finalmente, las células se lavaron con PBS frío y se resuspendieron en PBS para su lectura. Se analizaron 10,000 células por muestra en el Citómetro Attune Azul-Violeta (Applied Biosystems) utilizando el canal BL3.

LÍNEA CELULAR JURKAT

Silenciamiento génico de las calpaínas 1, 2 y 10 en las células Jurkat

Se manipuló la expresión génica de las células Jurkat (TIB-152; ATCC) para establecer células *knockdown* de las calpaínas 1, 2 y 10, y de un gen que no está presente en células de mamífero como control de transducción. Los silenciamientos génicos se realizaron con partículas de transducción lentivirales (Control, SHC002V; CAPN1, SHCLNV-NM_005186; CAPN2, SHCLNV-NM_001748; y CAPN10, SHCLNV-NM_021251, Sigma-Aldrich; **Figura 9**). Los vectores contienen una secuencia que codifica para un shRNA contra el gen que se silenciará y una secuencia que codifica para la enzima puromicina N-acetiltransferasa (PAC), que convierte a las células transducidas en células resistentes a puromicina, un antibiótico citotóxico que inhibe la síntesis de proteínas y que se usó como agente de selección para descartar las células sin transducir.

Para establecer las células *knockdown* estables se utilizó el protocolo del proveedor de las partículas lentivirales. Brevemente, se realizó una curva de selección para encontrar la concentración mínima de puromicina que mata al mayor porcentaje de células Jurkat sin

transducir. Posteriormente, se estableció la multiplicidad de infección (MOI), o el número de partículas lentivirales por célula que se necesitan para realizar una transducción óptima. A continuación, se incubaron 0.1×10^6 células Jurkat por línea celular (Control^{shRNA}, CAPN1^{shRNA}, CAPN2^{shRNA} y CAPN10^{shRNA}) en medio RPMI-1640 (ThermoFisher) por 24 horas a 37°C con la MOI determinada anteriormente. Al día siguiente, las células se lavaron y sembraron en medio RPMI-1640 fresco con puromicina para obtener células resistentes a puromicina. Las células resultantes permanecieron en estas condiciones durante un mes.

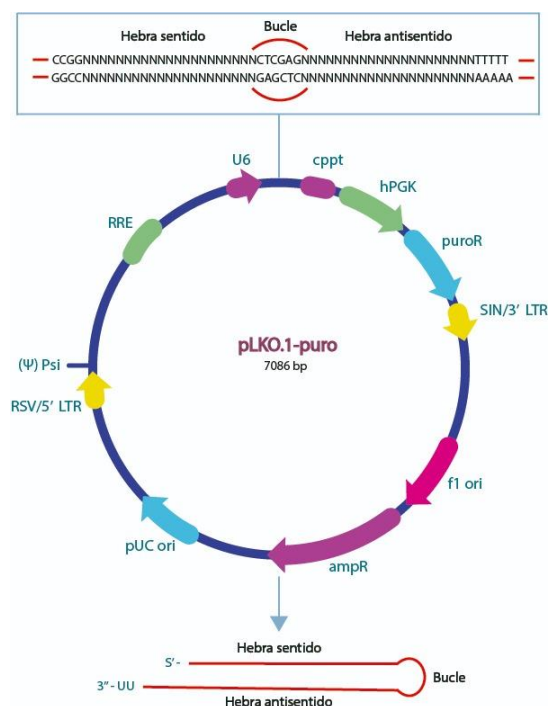


Figura 9. Vector pLKO.1-puro. El vector está constituido por las regiones: U6 o promotor U6, cppt o tracto central de la polipurina, hPGK o promotor de la fosfoglicerato quinasa humana, puroR o gen de resistencia a puromicina para la selección de células, SIN/3' LTR o secuencia 3' de repetición larga, f1 ori u origen de la replicación del bacteriófago f1, ampR o gen de resistencia a la ampicilina para la selección bacteriana, pUC ori u origen de replicación pUC, RSV/5' LTR o secuencia 5' de repetición larga del virus del sarcoma de Rous, Psi o señal de empaquetamiento de ARN y RRE o elemento de respuesta Rev. Modificada de: "MISSION® shRNA Vector Maps".

Validación de los *knockdown* de calpaína 1, 2 y 10 por qPCR y Western Blot

Determinación de los niveles de mRNA por PCR en tiempo real (qPCR)

Con el fin de validar los silenciamientos génicos se extrajo y purificó el RNA total de linfocitos primarios y de las células *knockdown* Jurkat utilizando el sistema "RNeasy Mini

kit” (Qiagen). El RNA se cuantificó con un espectrofotómetro NanoDrop™ (Thermo Scientific™), y se sintetizó el cDNA correspondiente con el “*SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix*” (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para medir los niveles de mRNA de las células linfoides se realizó una PCR en tiempo real (qPCR) utilizando el “*TaqMan Universal Master Mix*” (Applied Biosystems) y las sondas fluorogénicas TaqMan para CAPN1 (Hs00559804_m1; Applied Biosystems), CAPN2 (Hs00965097_m1; Applied Biosystems), CAPN10 (Hs01550167_m1; Applied Biosystems) y GUSB como control de expresión constitutiva (Hs00939627_m1; Applied Biosystems). La expresión relativa se calculó utilizando los valores del ciclo umbral (C_T)³ y el método comparativo $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$ de linfocitos y de las células CAPN1^{shRNA}, CAPN2^{shRNA}, CAPN10^{shRNA} y Control^{shRNA}.

Determinación de la abundancia proteica por Western blot

Para determinar la abundancia de CAPN1, CAPN2 y CAPN10 en las líneas celulares *knockdown* se extrajo la proteína total de 5×10^6 células con PBS + 0.1% Triton X100 + 1% SDS + inhibidores de proteasas y fosfatasa. Los lisados se centrifugaron por 18 minutos a 13,000 rpm y los sobrenadantes se cuantificaron con el “*DC Protein Assay*” (BioRad). La proteína extraída se diluyó con el buffer de carga (Tris 0.5 M pH 6.8, glicerol 10.5%, SDS 10%, azul de bromofenol 0.05% + β -mercaptoetanol 5%), y se desnaturalizó a 85°C. Se corrieron 20 μ g de proteína en geles de SDS-poliacrilamida al 12%. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa en una cámara semi-húmeda (BioRad) durante 50 minutos. Después, se bloquearon con leche baja en grasa (4%, Santa Cruz Biotechnology) durante 1 hora y se incubaron a 4° C con los anticuerpos primarios que reconocen a las proteínas humanas: anti-calpaína 1 de ratón (ab3589, Abcam; FD 1:5000), anti-calpaína 2 de conejo (ab126600, Abcam; FD 1:10000) y anti-calpaína 10 de conejo (ab28226, Abcam; FD 1:1000) durante toda la noche. Al día siguiente las membranas se lavaron tres veces con TBS + 0.1% de Tween-20 y se incubaron por una hora con los anticuerpos secundarios conjugados con la peroxidasa de rábano picante: anti-ratón de cabra (sc-2005, Santa Cruz Biotechnology;

³ “*Threshold cycle*” o ciclo umbral es la intersección entre una curva de amplificación y la línea umbral, corresponde a una medida relativa de la concentración del gen objetivo en la reacción de PCR.

FD 1: 4000) y anti-conejo de cabra (sc-2004, Santa Cruz Biotechnology; FD 1:6000). Para la detección de β -Actina se empleó el anticuerpo primario anti-actina de cabra (sc-1616, Santa Cruz Biotechnology; FD 1:1000) y el anticuerpo secundario anti-cabra de burro (sc-2020, Santa Cruz Biotechnology; FD 1:200). Ambos anticuerpos se incubaron en leche baja en grasa al 4% durante una hora a temperatura ambiente. Las inmunotransferencias se revelaron por quimioluminiscencia con el “*Enhanced Chemiluminescence Prime*” (Amersham) y se expusieron en películas de rayos X “*Hyperfilm*” (Amersham).

Determinación de la actividad de calpaínas por hidrólisis del sustrato CMAC, t-BOC-Leu-Met en células Jurkat *knockdown* de calpaína 1 y 10

Se utilizó el protocolo previamente descrito para linfocitos primarios en la página 22, con modificaciones en los tiempos de incubación con KRH y el sustrato fluorogénico CMAC, t-BOC-Leu-Met (Molecular Probes). Brevemente, se usaron 0.5×10^6 células por condición y se incubaron por dos horas a 37°C en medio RPMI-1640 suplementado con 5.6 mM de glucosa. Después, las células se lavaron e incubaron a 37°C en KRH con 3.9, 5.6, 11.1 y 15.6 mM de glucosa por 30 minutos. Posteriormente se agregó KRH más el sustrato y las muestras permanecieron a 37°C por 15 minutos más. Finalmente, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS y se evaluó la fluorescencia de 20,000 células por muestra en el canal VL1 del Citómetro Attune Azul-Violeta (Applied Biosystems) para determinar la hidrólisis del sustrato, equivalente a la actividad de calpaínas.

Captación de glucosa en células Jurkat *knockdown* de calpaína 1 y 10

La captación de 2-DG en las líneas CAPN1^{shRNA}, CAPN10^{shRNA} y Control^{shRNA} se midió con el mismo sistema utilizado en los linfocitos primarios (“*Glucose Uptake Assay Kit*”, Abcam). Se incubaron 0.5×10^6 células por condición a 37°C en medio RPMI-1640 con 5.6 mM de glucosa durante dos horas. Después, las células se lavaron con PBS e incubaron a 37°C en el amortiguador KRH con 3.9, 5.6, 11.1 y 15.6 mM de glucosa por 30 minutos. A continuación, se agregó 2-DG [1 mM]_F por 20 minutos, y se siguieron las especificaciones del fabricante.

Abundancia de GLUT1 total por Western blot en las células Jurkat *knockdown* de calpaína 1 y 10

Se lisaron 5×10^6 células de las líneas CAPN1^{shRNA}, CAPN10^{shRNA} y Control^{shRNA}, se extrajo la proteína total y se cuantificó con el método descrito anteriormente. Después, se corrieron 40 µg de proteína en geles de SDS-poliacrilamida al 12% en una cámara de electroforesis (Bio-Rad). Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa en una cámara semi-húmeda (BioRad). Las membranas se bloquearon con leche baja en grasa (Santa Cruz Biotechnology) durante 1 hora y se incubaron por toda la noche a 4° C con el anticuerpo primario de ratón contra el dominio extracelular de GLUT1 (LS-C129284; LifeSpan Biosciences; 1:1000). Al día siguiente las membranas se lavaron con TBS + 0.1% de Tween-20 y se incubaron por una hora con el anticuerpo secundario conjugado con la peroxidasa de rábano picante: anti-ratón de cabra (sc-2005, Santa Cruz Biotechnology; FD 1: 4000). Las inmunotransferencias se revelaron por quimioluminiscencia el “*Enhanced Chemiluminescence Prime*” (Amersham) y se expusieron en películas de rayos X “*Hyperfilm*” (Amersham). La β-Actina se detectó como se describió anteriormente.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se obtuvieron los valores de la mediana de la intensidad de fluorescencia (MIF) de los experimentos evaluados por citometría de flujo y se analizaron en el software FlowJo V10.5.0 (© FlowJo). Los datos de los experimentos de captación de glucosa se obtuvieron con el software SoftMax (Molecular Devices). Para el análisis de las placas de *Western blot* se midió la densidad óptica de las bandas (OD) con el software Image Studio Lite V5.2 y los datos se ajustaron a los niveles de β -actina (LI-COR Biosciences). En linfocitos primarios, los valores de viabilidad se normalizaron a los niveles de las células control; los valores de hidrólisis de sustrato, captación de glucosa y GLUT1 se normalizaron a los niveles de las células tratadas con DMSO y posteriormente se compararon entre individuos. Los datos en las líneas celulares CAPN1^{shRNA}, CAPN2^{shRNA} y CAPN10^{shRNA} se ajustaron a los adquiridos en la línea control Control^{shRNA}.

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software) y dependiendo del tamaño de la muestra se usó la prueba de Kolmogorov-Smirnov o la de Shapiro-Wilk para determinar si la distribución de los datos se ajustaba o no a una distribución normal. A los datos con distribución normal se les realizó un análisis de varianza (ANOVA), con la prueba post hoc Tukey para comparaciones múltiples. A los datos de hidrólisis del sustrato y captación de glucosa en células Jurkat, por tener dos variables (Concentración de glucosa y línea celular) se les realizó una ANOVA de dos vías con post hoc Tukey. A los datos que no tuvieron una distribución normal se les realizó una prueba Kruskal-Wallis con post hoc Dunn. En todos los ensayos se consideró como diferencia significativa aquella con $p < 0.05$. A continuación, los datos se presentan como la mediana \pm rango intercuartílico⁴, con los valores superiores e inferiores en cada población, donde $a > b > c$.

⁴ En una distribución ordenada corresponde al Q3 (75% de los datos) – Q1 (25% de los datos).

RESULTADOS

Los donadores de sangre periférica que participaron en el estudio tuvieron índices de masa corporal (IMC) dentro del rango normal (18.5 – 24.99; **Tabla 2**). Los parámetros bioquímicos de glucosa, triglicéridos y colesterol permanecieron dentro de los valores de referencia, sin embargo, las concentraciones de HDL fueron menores a los rangos normales (31.5 ± 6.7 vs 35 – 85 mg/dL; **Tabla 2**). Esto concuerda con reportes de bajos niveles séricos de HDL en población mexicana (Aguilar-Salinas *et al.*, 2010).

Tabla 2. Características antropométricas y parámetros bioquímicos de los donadores. Los valores de referencia corresponden a la Asociación Americana del Corazón (AHA) (Grundy Scott M. *et al.*, 2018).

Medidas antropométricas	
	n=10
Edad (años)	24 ± 5.0
Peso (kg)	63 ± 9.0
Talla (m)	1.7 ± 0.1
IMC (kg/m ²)	23 ± 2.0

Parámetros bioquímicos	Valores de referencia
Glucosa [mg/dL]	78 ± 8 <100
Triglicéridos [mg/dL]	77 ± 14 <170
Colesterol [mg/dL]	142 ± 29 <200
HDL [mg/dL]	32 ± 7 >45

Los inhibidores de calpaínas y de catepsinas no alteran la viabilidad celular

Para determinar la citotoxicidad de los tratamientos con diferentes concentraciones de inhibidores de proteasas de cisteína (calpaínas y catepsinas; **Tabla 1**) se calculó el porcentaje de células viables (AV-PE/7AAD negativas). Los resultados muestran que la inhibición a corto plazo de las calpaínas y las catepsinas (tratamiento de 40 minutos) no disminuyó la viabilidad celular (**Figura 10A- E**).

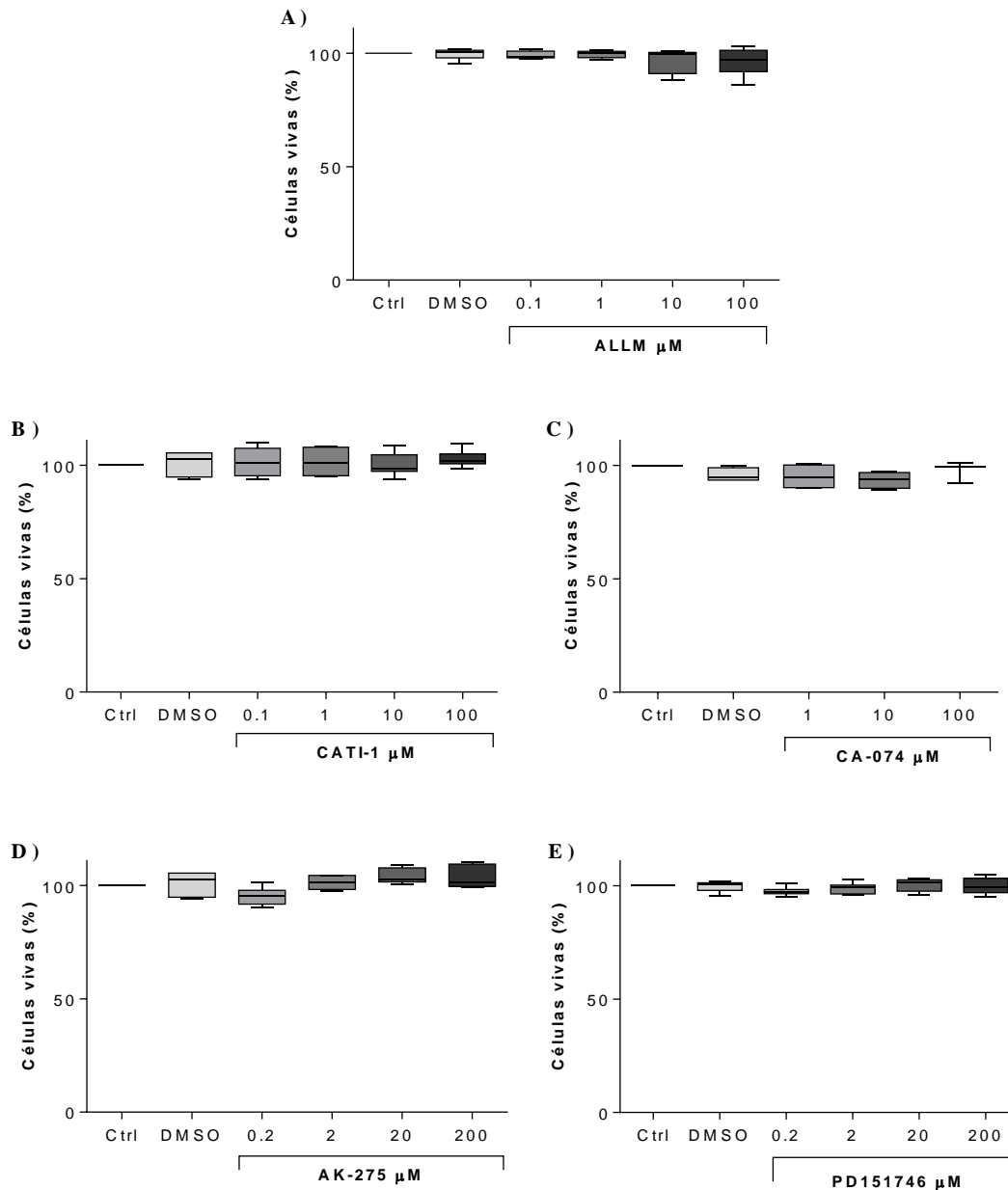


Figura 10. El tratamiento con inhibidores de calpaínas y catepsinas no altera la viabilidad celular de linfocitos. Porcentaje de células vivas en presencia de 3.9 mM de glucosa extracelular y **A)** ALLM (inhibidor de proteasas de cisteína); **B)** CATI-1 (inhibidor de catepsinas B, L, y S); **C)** CA-074 (inhibidor de catepsina B); **D)** AK-275 (inhibidor de calpaínas) y con **E)** PD151746 (inhibidor de calpaínas). Las gráficas muestran la mediana \pm rango intercuartílico. Los datos por donador se normalizaron respecto al control y después se compararon entre individuos.

La inhibición de las calpaínas reduce la hidrólisis del sustrato CMAC, t-BOC-Leu-Met

Las calpaínas y las catepsinas comparten similitudes en sus sitios catalíticos y en algunos de sus sustratos. Para demostrar la selectividad de las calpaínas por el sustrato CMAC, t-BOC-Leu-Met se compararon los efectos de inhibidores de ambas familias de proteasas en la hidrólisis del sustrato en linfocitos primarios. Los valores obtenidos se normalizaron respecto al control con DMSO. El inhibidor ALLM (contra proteasas de cisteína) indujo la disminución de la hidrólisis del sustrato, de manera dependiente de la concentración (**Figura 11A**, $p < 0.001$). Lo que corrobora que las proteasas de cisteína participan en la hidrólisis del sustrato.

Para diferenciar entre el efecto de las calpaínas y las catepsinas se utilizó el inhibidor de catepsinas B, L y S (CATI-1), el inhibidor específico de catepsina B (CA-074) y los inhibidores de calpaínas (AK-275 y PD151746). El inhibidor CATI-1 redujo la hidrólisis del sustrato, únicamente con la concentración de 100 μM (**Figura 11B**, $p < 0.001$). Esto sugiere que las catepsinas tienen un papel menor en la hidrólisis de este sustrato. El inhibidor CA-074 no redujo la hidrólisis a ninguna concentración (**Figura 11C**), por lo que la catepsina B no tiene efecto sobre la hidrólisis del sustrato.

Por el contrario, tanto el inhibidor AK-275, como el inhibidor PD151746 disminuyeron la hidrólisis del sustrato de forma dependiente de la concentración (**Figura 11D y E**, $p < 0.001$). Estos datos demuestran que las calpaínas son las principales proteasas de cisteína que realizan la hidrólisis del sustrato CMAC, t-BOC-Leu-Met.

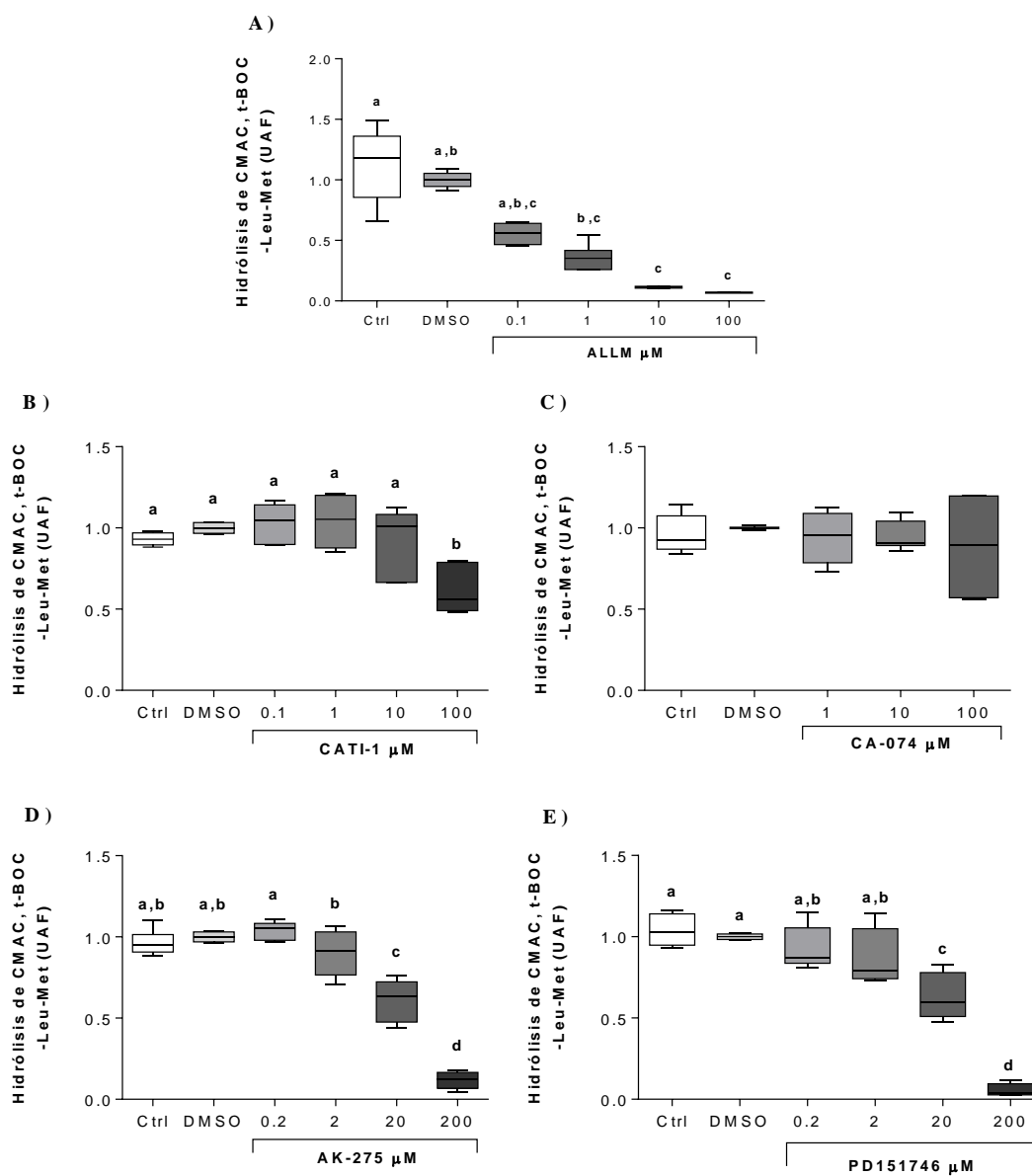


Figura 11. La hidrólisis del sustrato CMAC, t-BOC-Leu-Met disminuye por la inhibición farmacológica de las calpaínas y las catepsinas. Hidrólisis del sustrato fluorogénico en linfocitos en presencia de $3.9 \mu\text{M}$ de glucosa extracelular y los inhibidores: **A)** ALLM, **B)** CATI-1, **C)** CA-074, **D)** AK-275 y **E)** PD151746. Las gráficas muestran la mediana \pm rango intercuartílico. Los datos por donador se normalizaron respecto al control con DMSO y después se compararon entre individuos. Las diferentes letras indican diferencias estadísticas con $p < 0.05$, donde $a > b > c$ (ANOVA de una vía con post hoc Tukey o Kruskal-Wallis con post hoc Dunn). Unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF).

Las calpaínas promueven la captación de glucosa mientras que las catepsinas la inhiben

Para evaluar el efecto de la inhibición a corto plazo de las calpaínas y las catepsinas sobre la captación de 2-DG, se usaron los inhibidores ALLM (100 μ M), CATI-1 (100 μ M), AK-275 (200 μ M) y PD151746 (200 μ M). Además, se utilizó como control positivo a la citocalasina B (50 μ M), que es un inhibidor de los transportadores de glucosa. Se observó que el inhibidor CATI-1 indujo un aumento en la captación de glucosa (**Figura 12A**, $p < 0.001$). Sugiriendo que las catepsinas B, L y S regulan de manera negativa la captación de glucosa. No se observaron diferencias significativas entre la captación de glucosa de linfocitos tratados con los inhibidores ALLM y AK-275 (**Figura 12B**). Por el contrario, el inhibidor PD151746 redujo significativamente la captación de glucosa con respecto al control con DMSO (**Figura 12B**, $p < 0.001$). Esto sugiere que las calpaínas podrían regular de manera positiva la captación de glucosa.

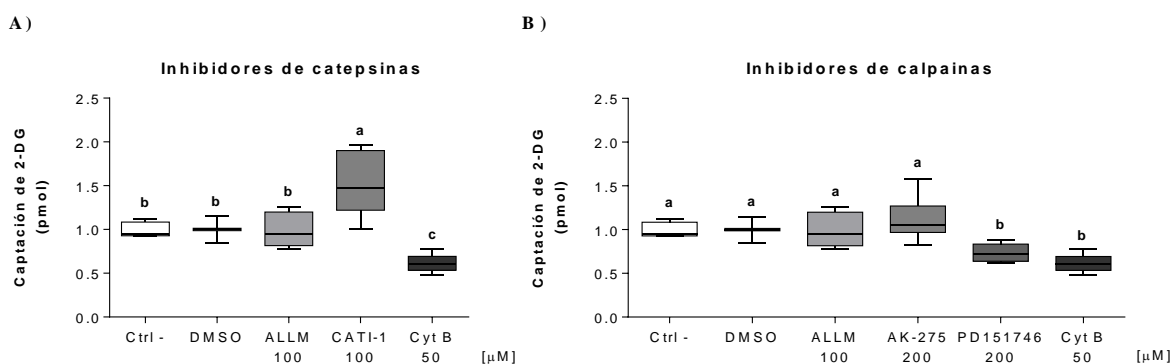


Figura 12. Las calpaínas promueven la captación de glucosa, mientras que las catepsinas B, L y S la inhiben. Captación de 2-DG de linfocitos en presencia de 3.9 mM de glucosa extracelular e: **A)** Inhibidores de catepsinas (ALLM, CATI-1) e **B)** Inhibidores de calpaínas (ALLM, AK-275 y PD151746). Se utilizó citocalasina B como control positivo de la inhibición de la captación de glucosa. Las gráficas muestran la mediana \pm rango intercuartílico de seis experimentos independientes. Los datos por donador se normalizaron respecto al control con DMSO y después se compararon entre individuos. Las diferentes letras indican diferencias estadísticas con $p < 0.05$, donde $a > b > c$ (ANOVA de una vía con post hoc Tukey).

La inhibición a corto plazo de las calpaínas y las catepsinas no modifica la abundancia de GLUT1 en membrana

Para determinar si las catepsinas y las calpaínas modulan la captación de glucosa, mediante la regulación de la localización de GLUT1, se analizó la abundancia en membrana plasmática de este transportador. El tratamiento con los inhibidores CATI-1 (100 μM) y PD151746 (200 μM), no alteraron la abundancia de GLUT1 con respecto al control con DMSO (*Figura 13*). Lo que indica que la inhibición a corto plazo de las calpaínas y las catepsinas no altera la abundancia de GLUT1 en membrana plasmática.

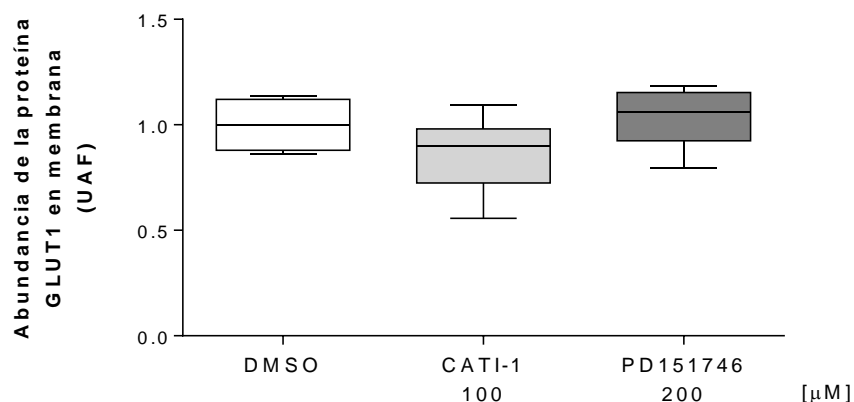


Figura 13. La inhibición a corto plazo de las calpaínas y de las catepsinas no tiene efecto en la translocación de GLUT1. Se evaluó por citometría de flujo la abundancia relativa del transportador GLUT1 en membrana plasmática de linfocitos en presencia de 3.9 mM de glucosa extracelular, y tratados con el inhibidor CATI-1 y el inhibidor PD151746. La gráfica muestra la mediana \pm rango intercuartílico de tres experimentos independientes con duplicados técnicos. Los datos por donador se normalizaron respecto al control con DMSO y después se compararon entre individuos. ANOVA de una vía con post hoc Tukey.

Las células Jurkat se pueden transducir exitosamente con partículas lentivirales desde una MOI de 2

Para evaluar específicamente si la CAPN1, CAPN2 o CAPN10 participan en la captación de glucosa en células linfoides, se establecieron líneas celulares *knockdown* para cada una de estas calpaínas.

Se determinaron las condiciones para establecer las líneas *knockdown* estables. Primero, se realizó una curva de muerte celular, para detectar la concentración mínima de puromicina para matar a la mayor cantidad de células sin transducir. Se encontró que a una concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$ la viabilidad disminuye en un 98% (**Figura 14A**). Posteriormente, se estableció la multiplicidad de infección (MOI) de partículas lentivirales para transducir a las células Jurkat. Se transdujeron células con una MOI de 2, 5 o 10 y se trataron con puromicina por 48 h. Se obtuvo el 39% de eficiencia en la transducción con la MOI de 2, del 41% con la MOI de 5 y del 81% con la MOI de 10 (**Figura 14B**).

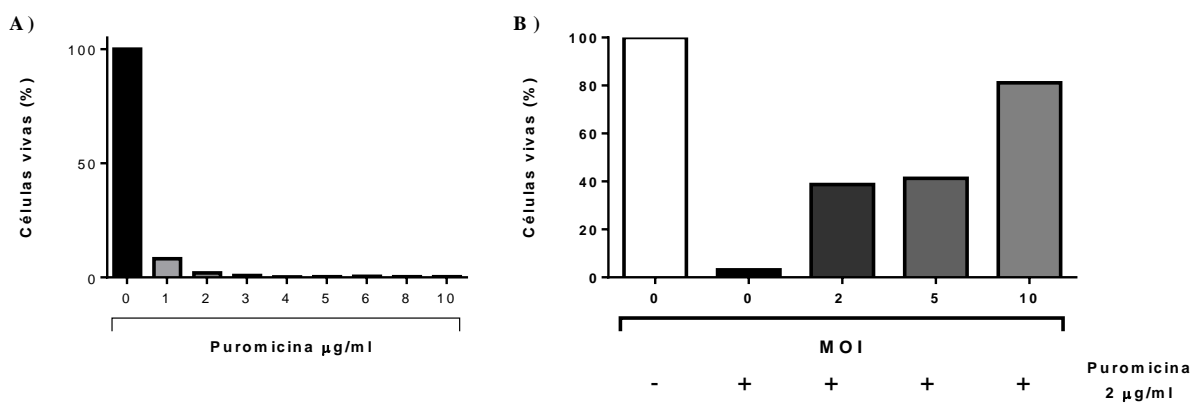


Figura 14. Las células Jurkat se transducen exitosamente desde una MOI de 2. A) Viabilidad de células Jurkat tratadas con diferentes concentraciones del antibiótico puromicina. B) Viabilidad de células Jurkat transducidas con MOI de 2, 5 o 10 partículas lentivirales por célula y tratadas con 2 $\mu\text{g/ml}$ de puromicina. Los datos fueron normalizados con respecto al control sin puromicina. La gráfica muestra los valores de un experimento.

Validación de las células *knockdown* por qPCR

Para establecer las células control (Control^{shRNA}), y las células *knockdown* de CAPN1, CAPN2 y CAPN10 (CAPN1^{shRNA}, CAPN2^{shRNA} y CAPN10^{shRNA}), se escogió la menor MOI a la que se transducen las células Jurkat para evitar alteraciones genotípicas. Después, las células se trataron con 2 µg/ml de puromicina durante un mes para seleccionar las células *knockdown*. La validación de los silenciamientos génicos demostró que los niveles de mRNA de CAPN1 disminuyeron 86% en las células CAPN1^{shRNA} (**Figura 15A**, $p < 0.001$), y un 25% en las células CAPN10^{shRNA}. Los niveles de mRNA de CAPN10 se redujeron 58% en la línea CAPN10^{shRNA} (**Figura 15B**, $p < 0.001$), mientras que en la línea CAPN1^{shRNA} los niveles fueron comparables a los observados en la línea Control^{shRNA}. Los niveles de expresión de CAPN2 en las células Control^{shRNA} fueron demasiado bajos y no se pudo realizar el análisis. Estos datos demuestran, que el *knockdown* de CAPN10 es más específico a nivel de mRNA que el *knockdown* de CAPN1.

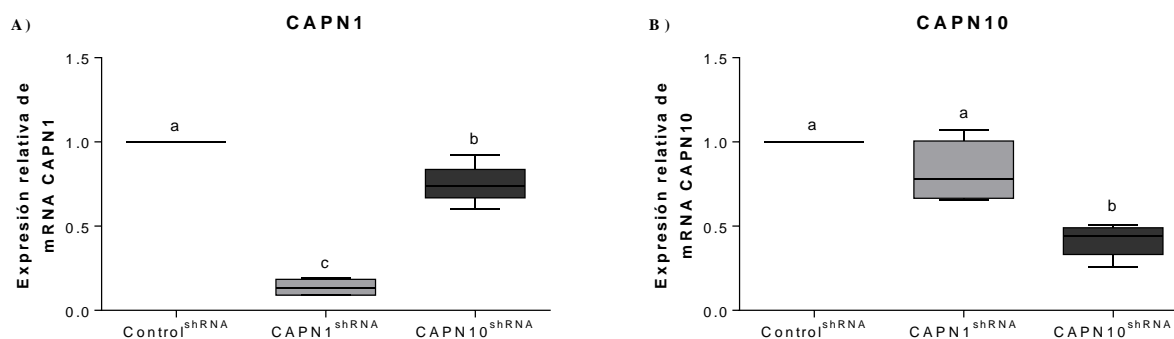


Figura 15. Validación de los silenciamientos génicos de CAPN1 y CAPN10 por qPCR en la línea celular Jurkat. A) Niveles de mRNA de CAPN1 en las líneas *knockdown* de CAPN1 y CAPN10. B) Niveles de mRNA de CAPN10 en las líneas *knockdown* de CAPN1 y CAPN10. Las gráficas muestran la mediana ± rango intercuartílico de dos experimentos independientes con triplicados técnicos. Los datos fueron normalizados respecto al gen de expresión constitutiva (GUSB), y a las células Control^{shRNA}. Las diferentes letras indican diferencias estadísticas con $p < 0.05$, donde $a > b > c$ (ANOVA de dos vías con post hoc Tukey).

Validación de las células *knockdown* por Western blot

Las células CAPN1^{shRNA}, CAPN2^{shRNA} y CAPN10^{shRNA} se validaron a nivel de proteína por Western blot. Para determinar la eficiencia del *knockdown*, se analizaron los cambios en los niveles de cada una de las bandas en las líneas celulares. En las células Control^{shRNA}, CAPN1 aparece como una sola banda de 75 kDa, que corresponde a CAPN1 intacta. La abundancia a nivel de proteína de CAPN1 se redujo significativamente en un 61% en la línea CAPN1^{shRNA} (**Figura 16A y B**, $p < 0.001$), y en la línea CAPN10^{shRNA} no disminuyó. No se observaron bandas inmunoreactivas con anticuerpos contra CAPN2 en las células Control^{shRNA}.

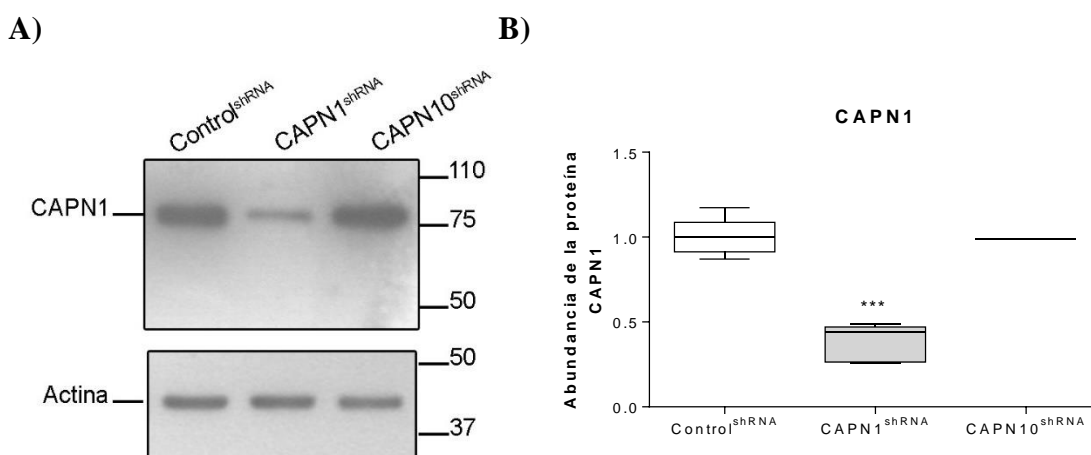
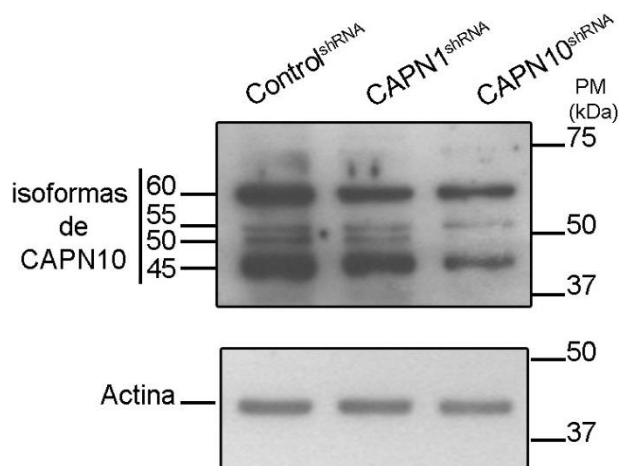


Figura 16. La abundancia de la proteína CAPN1 disminuye en células *knockdown* de CAPN1. Se extrajo la proteína total de las células Control^{shRNA}, CAPN1^{shRNA} y CAPN10^{shRNA}. La abundancia de CAPN1 se evaluó por Western Blot. **A)** Blot representativo de los inmunoblots. **B)** La gráfica muestra la mediana \pm rango intercuartílico de cuatro experimentos en la línea Control^{shRNA} y CAPN1^{shRNA} y de un experimento en la línea CAPN10^{shRNA}. *** $p < 0.05$ (t-Student).

En las células Control^{shRNA} se observaron cuatro isoformas de CAPN10 de aproximadamente 45, 50, 56 y 60 kDa. De manera interesante, no se observó la CAPN10a con un peso molecular estimado de 75 kDa. En la línea CAPN10^{shRNA} se observó una reducción significativa en todas las isoformas de CAPN10 (entre el 40 y el 60% respecto a las células Control^{shRNA}, **Figura 17A y B**, $p < 0.001$). Aunque los niveles de mRNA de CAPN10 en la línea celular CAPN1^{shRNA} disminuyeron significativamente con respecto a las células Control^{shRNA} (**Figura 15B**), no se observó una reducción importante en la abundancia de CAPN10 en las células CAPN1^{shRNA} (**Figura 17B**).

A)



B)

Isoforma	Control ^{shRNA}	CAPN1 ^{shRNA}	CAPN10 ^{shRNA}	Valor de p
60 kDa	1 ± 0.13	0.67 ± 0.06	0.52 ± 0.08	p<0.01
54 kDa	1 ± 0.18	0.85 ± 0.14	0.55 ± 0.05	p<0.01
50 kDa	1 ± 0.10	0.81 ± 0.11	0.42 ± 0.00	p<0.01
45 kDa	1 ± 0.20	0.83 ± 0.12	0.39 ± 0.19	p<0.01

Figura 17. La abundancia de las isoformas de la proteína CAPN10 disminuye en las células *knockdown* de calpaína 10. Se extrajo la proteína total de las células Control^{shRNA}, CAPN1^{shRNA} y CAPN10^{shRNA}. La abundancia de CAPN10 se evaluó por Western blot. **A)** Blot representativo de los inmunoblots. **B)** Tabla con el análisis estadístico de la abundancia de las isoformas de 60, 54, 50 y 45 kDa de CAPN10. Los datos representan la media ± la desviación estándar. Los números en negritas indican diferencias estadísticas. p<0.05 (Kruskal-Wallis con post hoc Dunn's).

Las células Jurkat no expresan CAPN2

Al establecer la línea celular *knockdown* de CAPN2, se observó que los niveles de mRNA son muy bajos. Para descartar un problema con la sonda de CAPN2 usada, se evaluaron los niveles de mRNA de CAPN2 en linfocitos primarios y en las células Jurkat control. Se determinó que los niveles de mRNA de CAPN2 en las células Control^{shRNA} son casi 42,000 veces menores a los observados en linfocitos primarios (**Figura 18B**). Esto sugiere que la expresión de CAPN2 en las células Jurkat está por debajo del límite de detección. Por este motivo, no se estableció una línea celular *knockdown* de CAPN2.

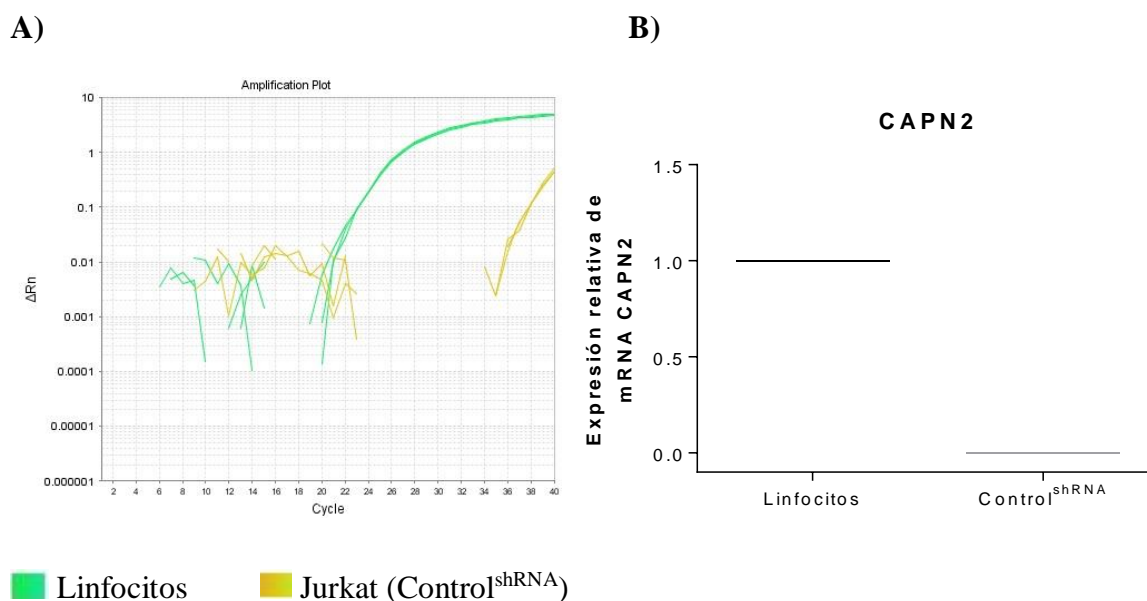


Figura 18. Las células Jurkat no expresan CAPN2. Se realizó una qPCR para comparar los niveles de mRNA de calpaína-2 en linfocitos extraídos de sangre periférica y en células Jurkat control. **A)** Diagrama de amplificación que representa los C_T a los que amplificó el cDNA de calpaína-2 en linfocitos (Verde) y en células Jurkat control (Amarillo). **B)** Niveles de mRNA de CAPN10 en linfocitos y en las células Control^{shRNA}. La gráfica muestra la mediana \pm rango intercuartílico de un experimento con triplicados técnicos. Los datos se normalizaron respecto al gen de expresión constitutiva (GUSB), y a la expresión en linfocitos.

CAPN10 se activa después de un estímulo con glucosa de forma dosis-dependiente desde concentraciones bajas, mientras que CAPN1 requiere altas concentraciones de glucosa para activarse.

Un trabajo previo de nuestro equipo mostró que, en linfocitos, la actividad de las calpaínas aumenta después de un reto con 15.6 mM de glucosa (Diaz-Villaseñor *et al.* 2008). Para determinar si la CAPN1 o CAPN10 participan en el aumento en la actividad de calpaínas inducido por glucosa, se midió la actividad de las calpaínas en las líneas celulares *knockdown* y Control^{shRNA} expuestas a 3.9, 5.6, 11.1 o 15.6 mM de glucosa. La actividad de calpaínas en las células Control^{shRNA} aumentó significativamente dependiendo de la concentración de glucosa extracelular desde 5.6 mM de glucosa (**Figura 19**, $p < 0.001$). En las células CAPN1^{shRNA}, la actividad de calpaínas solamente incrementó significativamente a partir de 11.1 mM de glucosa. Además, la actividad observada en 15.6 mM de glucosa fue significativamente menor, en comparación con las células Control^{shRNA} (**Figura 19**, $p < 0.001$). En las células CAPN10^{shRNA}, la actividad de las calpaínas disminuyó significativamente desde 5.6 mM de glucosa (**Figura 19**, $p < 0.001$). Estos datos sugieren que CAPN1 y CAPN10 se activan después de estimular células linfoides con glucosa extracelular. Además, CAPN10 requiere menos glucosa que CAPN1 para activarse.

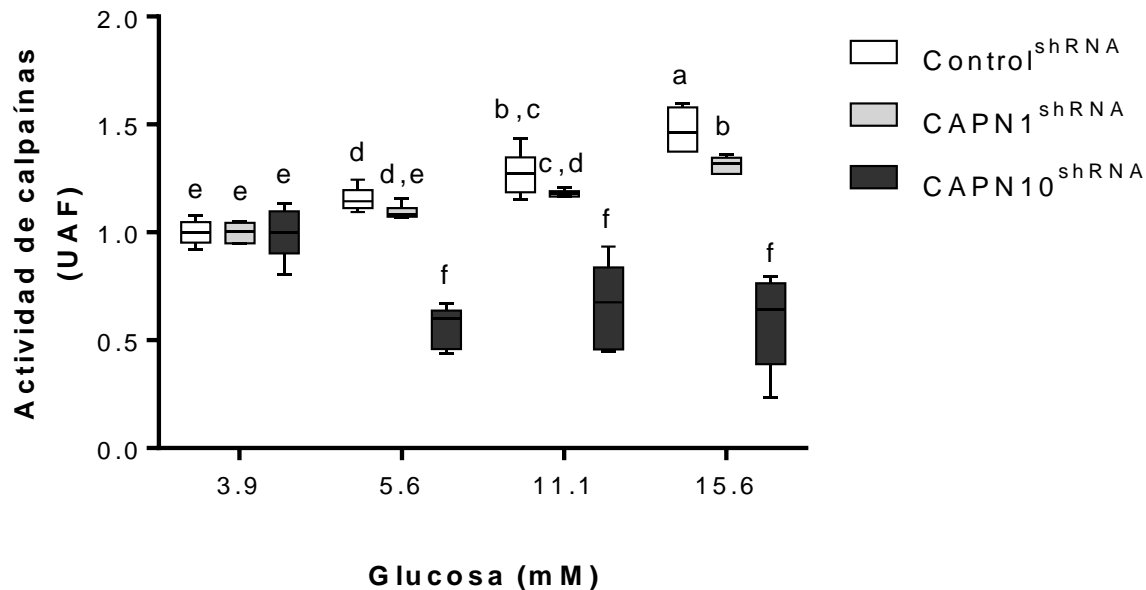


Figura 19. La actividad de las calpaínas después de estímulos con glucosa extracelular disminuye en las células *knockdown* de CAPN1 y CAPN10. La actividad de calpaínas de la línea Control^{shRNA} y de las líneas celulares *knockdown* de CAPN1 y CAPN10 se midió después de incubar las células con diferentes concentraciones de glucosa (3.9, 5.6, 11.1 o 15.6 mM). La gráfica muestra la mediana \pm rango intercuartílico de seis valores independientes. Los datos obtenidos se normalizaron respecto a la actividad de las células tratadas con 3.9 mM de glucosa. Las diferentes letras indican diferencias estadísticas. $p < 0.05$ (ANOVA de dos vías con post hoc Tukey). Unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF).

El *knockdown* de CAPN1 y de CAPN10 tienen efectos contrarios sobre la captación de glucosa

Se evaluó el efecto del *knockdown* de CAPN1 y de CAPN10 sobre la captación de 2-DG en células expuestas a 3.9, 5.6, 11.1 o 15.6 mM de glucosa extracelular. En las células Control^{shRNA}, la captación de glucosa disminuyó significativamente con el tratamiento de 11.1 y 15.6 mM de glucosa extracelular, de forma similar a lo reportado en linfocitos por Piątkiewicz y colaboradores. En la línea celular CAPN1^{shRNA}, la captación de glucosa se incrementó en promedio dos veces respecto a las células Control^{shRNA} en los tratamientos con 3.9, 5.6 y 11.1 mM de glucosa extracelular, pero no en las células tratadas con 15.6 mM de glucosa extracelular (**Figura 20**, $p < 0.001$). En las células CAPN10^{shRNA}, la captación de glucosa se redujo casi a la mitad bajo los tratamientos con 3.9 y 5.6 mM de glucosa (**Figura 20**, $p < 0.001$). Sin embargo, no se observaron diferencias entre las células CAPN10^{shRNA} y las células Control^{shRNA} cuando fueron tratadas con 11.1 o 15.6 mM de glucosa. Por lo tanto,

estos datos indican que CAPN1 regula negativamente la captación de glucosa, mientras que CAPN10 la regula positivamente.

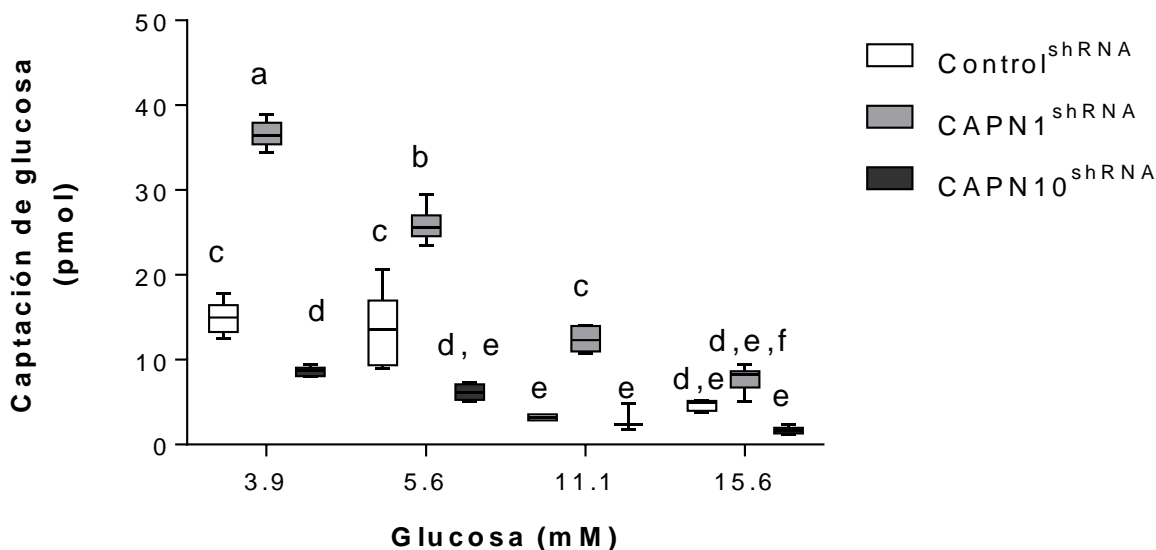


Figura 20. La captación de 2-DG en respuesta a estímulos con glucosa extracelular se altera en las células *knockdown* de CAPN1 y CAPN10. La captación de 2-DG de la línea Control^{shRNA} y de las líneas celulares *knockdown* de CAPN1 y CAPN10 se midió con un kit colorimétrico después de incubar las células con diferentes concentraciones de glucosa (3.9, 5.6, 11.1 o 15.6 mM). La gráfica muestra la mediana ± rango intercuartílico de al menos tres valores independientes de la concentración en pmol de 2-DG captada por las células. Las diferentes letras indican diferencias estadísticas. $p < 0.05$ (ANOVA de dos vías y con post hoc Tukey). B) Tabla de las concentraciones de 2-DG captada por las líneas *knockdown* y control. Los datos representan la media ± la desviación estándar.

La abundancia de GLUT1 disminuye en las células *knockdown* de CAPN10

GLUT1 es el transportador de glucosa más abundante e importante en células linfoides. Por lo tanto, para definir si las CAPN1 y CAPN10 regulan la captación de glucosa a través de GLUT1, se midió la abundancia total de GLUT1 a través de Western Blot. Las células Control^{shRNA} expresan una banda de aproximadamente 43 kDa. Se observó que en las células CAPN10^{shRNA}, la abundancia de GLUT1 disminuyó significativamente con respecto a las células control (**Figura 21A y B** $p < 0.05$). Estos datos sugieren que CAPN10 podría participar en la estabilidad de GLUT1.

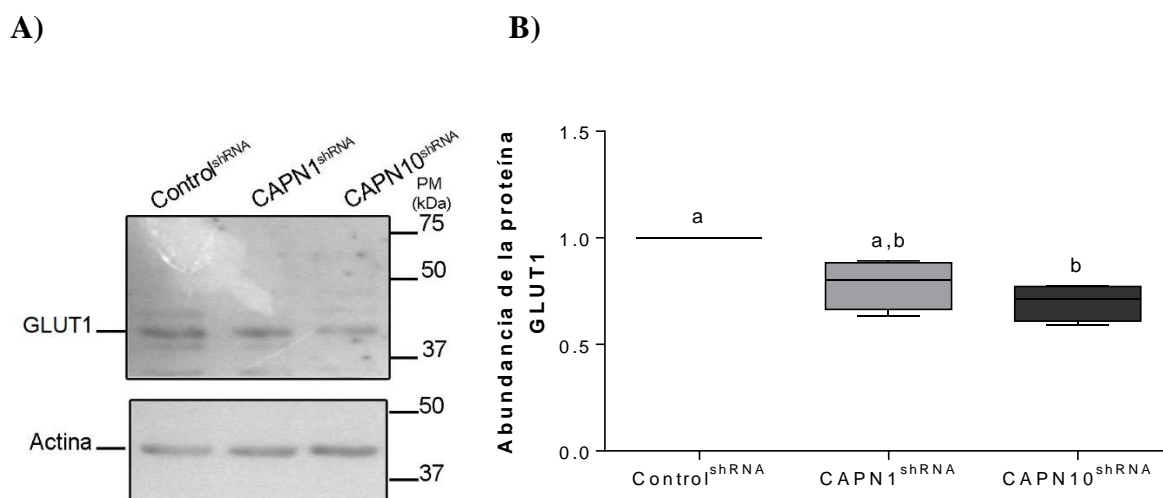


Figura 21. La abundancia de la proteína GLUT1 disminuye en las células CAPN10^{shRNA}. Se extrajo la proteína total de las células Control^{shRNA}, CAPN1^{shRNA} y CAPN10^{shRNA} y por Western Blot se evaluó la abundancia de GLUT1. La gráfica muestra la mediana \pm rango intercuartílico de cuatro experimentos. Las diferentes letras indican diferencias estadísticas. $p < 0.05$ (ANOVA de una vía con post hoc Tukey).

DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue determinar la participación de las CAPN1, CAPN2 y CAPN10 en la captación de glucosa en células linfoides. Se usaron dos modelos: linfocitos primarios y la línea celular Jurkat.

En el primer modelo se utilizaron inhibidores farmacológicos de calpaínas (ALLM, AK-275 y PD151746) y catepsinas (CATI-1, CA-074) en linfocitos primarios. Los resultados mostraron que las concentraciones usadas no fueron citotóxicas. Esto concuerda con estudios previos del inhibidor CATI-1 en PBMCs, y los inhibidores ALLM (100 μ M) y E-64d (200 μ M) en islotes pancreáticos (Ying Li, Li, Feng, Arnold, & Peng, 2009; Ying Li *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2003).

El sustrato CMAC, t-Boc, Leu, Met se ha utilizado en linfocitos para localizar a las calpaínas activas durante la migración celular (Svensson *et al.*, 2010) y para medir la actividad general de las calpaínas después de estímulos con glucosa extracelular (Díaz-Villaseñor *et al.*, 2008). Sin embargo, faltan estudios que validen la especificidad de este sustrato fluorogénico. Debido a la gran similitud que tienen los dominios catalíticos de las calpaínas y las catepsinas, la primera fase de este estudio se enfocó en demostrar la especificidad de las calpaínas por el sustrato. Al incubar los linfocitos en 3.9 mM de glucosa, los inhibidores de calpaínas AK-275 y PD151746 disminuyeron la hidrólisis del sustrato de manera dosis-dependiente. En contraste, el inhibidor de catepsinas B, L y S (CATI-1) solamente redujo la hidrólisis del sustrato con la concentración más alta. Estos datos indican que las calpaínas son las principales proteasas de cisteína que realizan la hidrólisis del sustrato en linfocitos. Por lo tanto, se sugiere que la hidrólisis de este sustrato es un reflejo de la actividad de estas enzimas en linfocitos.

En cuanto a la captación de glucosa, no se encontraron alteraciones con el tratamiento de los inhibidores ALLM y AK-275. Sin embargo, en adipocitos 3T3-L1, el inhibidor ALLN disminuye la captación de glucosa inducida por insulina (Paul *et al.*, 2003). La discordancia entre los resultados en adipocitos, y los observados en linfocitos, podrían deberse a que el ALLM y el AK-275 actúan en el sitio catalítico de las calpaínas, y tienen afinidad por diversas calpaínas y otras proteasas como las catepsinas (Ono *et al.*, 2016). Esto podría

inducir respuestas contrarias en tipos celulares con un perfil de expresión de proteasas distinto. Se observó que el PD151746, que es un inhibidor con mayor selectividad por las calpaínas, disminuyó la captación de glucosa. De manera notable, la inhibición de la captación de 2-DG, fue similar a la observada con el control positivo de citocalasina B. Esto sugiere que las calpaínas regulan positivamente la captación de glucosa, de manera similar a lo observado en músculo y adipocitos (Logie, Brown, Yeaman, & Walker, 2005; Paul *et al.*, 2003; Sreenan *et al.*, 2001). En contraste, el inhibidor de catepsinas, CATI-1 indujo un aumento en la captación de glucosa. Esto concuerda con un trabajo previo, que reportó que la inhibición de catepsina L aumenta la captación de glucosa en adipocitos (Yang *et al.*, 2007). En conjunto, los datos sugieren que, en linfocitos, las calpaínas promueven la captación de glucosa mientras que las catepsinas la inhiben.

Para tratar de entender el mecanismo por el cual las calpaínas promueven la captación de glucosa y las catepsinas la inhiben, se midió la abundancia de GLUT1 en membrana plasmática. Sin embargo, ni el inhibidor CATI-1 ni el PD151746 indujeron cambios en la abundancia de este transportador. En contraste, el inhibidor de calpaínas ALLN disminuye la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática de adipocitos 3T3-L1; y los ratones *knockout* de catepsina L presentan altos niveles de GLUT4 en músculo esquelético (Paul *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2007). Estas discrepancias podrían deberse a que, en linfocitos, la regulación de GLUT1 y del transporte de glucosa por calpaínas difiere de lo reportado con GLUT4 en adipocitos y músculo esquelético. Otra posibilidad, que se evaluó en los modelos *knockdown*, es que sólo la inhibición a largo plazo de las calpaínas altera la abundancia de los transportadores de glucosa.

Debido a que no se conoce a detalle el mecanismo por el cual las calpaínas seleccionan a sus sustratos, no existen inhibidores selectivos para cada una de las diferentes calpaínas (Shinkai-Ouchi *et al.*, 2016). Por lo tanto, las técnicas para silenciar por RNAs de interferencia (siRNAs y shRNAs) o para sobre-expresar genes específicos, siguen siendo las mejores herramientas para identificar los efectos de una o más calpaínas (Ono *et al.*, 2016). Por esto, se realizaron *knockdown* estables de CAPN1 y CAPN10 en la línea Jurkat de células linfoides.

Se ha reportado que en células Jurkat, las calpaínas participan en el inicio de la apoptosis inducida por Ca^{2+} , y en la proliferación celular (Diaz & Bourguignon, 2000; Stifanese *et al.*, 2008). Específicamente, CAPN1 contribuye en la regulación del ciclo celular y la segregación cromosómica durante la mitosis. En este estudio, no se encontró la expresión de CAPN2 a nivel de mRNA ni de proteína. En concordancia, la base de datos Harmonizome ha reportado que el valor estándar de expresión de esta proteína es de -1.37, relativo a los niveles de expresión en 93 líneas celulares (Rouillard *et al.*, 2016). De hecho, en células Jurkat, CAPN2 está entre los 15 genes con menor expresión. Respecto a CAPN10, no existen reportes sobre su función en células Jurkat.

En los linfocitos, las calpaínas se activan después de estimular a las células con glucosa extracelular, pero aún se desconoce cuál de las 15 calpaínas es la responsable (Díaz-Villaseñor *et al.*, 2008, p.). En este trabajo, se encontró que en las células CAPN1^{shRNA}, la actividad de calpaínas fue menos sensible a la concentración de glucosa extracelular. Además, se demostró que en células CAPN10^{shRNA}, la actividad de las calpaínas disminuye desde la concentración de 5.6 mM de glucosa. Estos hallazgos correlacionan con los datos en células pancreáticas INS-1, en las que la exposición a glucosa induce un aumento en la abundancia de las isoformas de 54, 64 y 72 kDa de CAPN10 (Turner *et al.*, 2007). En conjunto, estos datos sugieren que CAPN10 es la principal calpaína que se activa después de estimular a las células con glucosa.

Para conocer el papel de CAPN1 y CAPN10 en la captación de la glucosa se evaluó la captación de 2-DG de las células CAPN1^{shRNA}, CAPN10^{shRNA} y Control^{shRNA}. Los resultados muestran que en las células Jurkat, la captación de 2-DG disminuyó en presencia de altas concentraciones de glucosa, de forma similar a lo reportado en linfocitos primarios (Oleszczak *et al.*, 2012). Mientras tanto, las células CAPN1^{shRNA} captaron hasta dos veces más glucosa en presencia de 3.9, 5.6 y 11.1 mM de glucosa extracelular. En contraste, la sobreexpresión de calpastatina en músculo esquelético no altera la captación de glucosa basal ni la estimulada por insulina o por contracciones musculares (Otani *et al.*, 2004; Otani, Polonsky, Holloszy, & Han, 2006). Sin embargo, a diferencia de las células Jurkat, las células musculares regulan el transporte de la glucosa a través de diversas vías de señalización que

son tejido-específicas. Será relevante realizar estudios que profundicen en el papel de la CAPN1 en la captación de glucosa en linfocitos.

Por otra parte, las células CAPN10^{shRNA}, en presencia de 3.9 y 5.6 mM de glucosa extracelular redujeron casi a la mitad la captación de 2-DG respecto a las células Control^{shRNA}. En adipocitos 3T3-L1 y en miotubos humanos se ha reportado que el *knockdown* de CAPN10 disminuye la captación de glucosa estimulada por insulina (Brown *et al.*, 2007; Paul *et al.*, 2003). En conjunto con nuestros datos se sugiere que CAPN10 es la calpaína responsable de regular la captación de la glucosa en diferentes tipos celulares.

En las células CAPN10^{shRNA}, los niveles totales de GLUT1 disminuyeron significativamente, sugiriendo que la reducción en la captación de 2-DG podría estar asociada a una menor disponibilidad de GLUT1. La abundancia de GLUT1 se puede relacionar con los niveles de expresión de su mRNA o a una alteración en su translocación y su consecuente degradación vía lisosomal. Sin embargo, la expresión de GLUT1 y GLUT4 no se encontró alterada en miotubos *knockdown* de CAPN10 (Brown *et al.*, 2007). Además, el *knockdown* de CAPN10 en adipocitos 3T3-L1 redujo la translocación de GLUT4 estimulada por insulina (Paul *et al.*, 2003). Estos datos indican que CAPN10 podría regular la translocación y la abundancia de los transportadores de glucosa en diferentes tipos celulares.

En linfocitos, la inhibición de la actividad general de las calpaínas disminuye la diapédesis celular, la proliferación celular dependiente de CD3/CD28 y la expresión y función de IL-2 y CD25 (Hussain, Zhang, & Murray, 2005; Mikosik *et al.*, 2013, 2016; Noguchi *et al.*, 1997). Además, en linfocitos T, la actividad de CAPN1 es mayor a la de CAPN2, y su inhibición reduce la secreción de TNF α , IL-6, IL-17A, IL-1B, IL-8, IFN γ e IL-10 (Mikosik *et al.*, 2016). Esto nos indica que la actividad de las calpaínas en linfocitos podría modular la respuesta inmune.

Finalmente, los datos de este trabajo aportan evidencia de que CAPN10 promueve la captación de glucosa, mientras que CAPN1 la inhibe en células linfoides. Además, sugiere que los linfocitos son un buen modelo para estudiar el transporte de la glucosa y sus alteraciones en la respuesta inmune o en enfermedades como la DT2.

CONCLUSIONES

En células linfoides:

- ∞ La hidrólisis del sustrato CMAC, t-BOC-Leu-Met es mediada principalmente por calpaínas.
- ∞ La inhibición farmacológica de las calpaínas disminuye la captación de glucosa sin alterar los niveles de GLUT1 en membrana.
- ∞ Las células Jurkat no expresan CAPN2, y su ausencia no disminuye la captación de glucosa.
- ∞ La CAPN1 y CAPN10 se activan después de un estímulo con glucosa de manera dosis-dependiente.
- ∞ El silenciamiento de CAPN1 aumenta la captación de glucosa, mientras que, el silenciamiento de CAPN10 la disminuye.
- ∞ El silenciamiento de CAPN10 reduce la proteína total de GLUT1.
- ∞ CAPN1 y CAPN10 regulan de forma antagónica la captación de glucosa en células linfoides.

REFERENCIAS

- Aguilar-Salinas, C. A., Gómez-Pérez, F. J., Rull, J., Villalpando, S., Barquera, S., & Rojas, R. (2010). Prevalence of dyslipidemias in the Mexican National Health and Nutrition Survey 2006. *Salud Pública de México*, 52(1). Recuperado de <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=10617418008>
- Branca, D. (2004). Calpain-related diseases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 322(4), 1098–1104. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.07.126>
- Brown, A. E., Yeaman, S. J., & Walker, M. (2007). Targeted suppression of calpain-10 expression impairs insulin-stimulated glucose uptake in cultured primary human skeletal muscle cells. *Molecular Genetics and Metabolism*, 91(4), 318–324. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2007.05.001>
- Cammann, C., Rath, A., Reichl, U., Lingel, H., Brunner-Weinzierl, M., Simeoni, L., ... Lindquist, J. A. (2016). Early changes in the metabolic profile of activated CD8+ T cells. *BMC Cell Biology*, 17(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s12860-016-0104-x>
- Campbell, R. L., & Davies, P. L. (2012). Structure–function relationships in calpains. *Biochemical Journal*, 447(3), 335–351. <https://doi.org/10.1042/BJ20120921>
- Carbó, R., & Guarner, V. (2010). Insulin effect on glucose transport in thymocytes and splenocytes from rats with metabolic syndrome. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 2(1), 64. <https://doi.org/10.1186/1758-5996-2-64>
- Carragher, N. O. (2006). Calpain inhibition: a therapeutic strategy targeting multiple disease states. *Current Pharmaceutical Design*, 12(5), 615–638.
- Covington, M. D., & Schnellmann, R. G. (2012). Chronic high glucose downregulates mitochondrial calpain 10 and contributes to renal cell death and diabetes-induced renal injury. *Kidney International*, 81(4), 391–400. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.356>
- Diaz, F., & Bourguignon, L. Y. (2000). Selective down-regulation of IP(3)receptor subtypes by caspases and calpain during TNF alpha -induced apoptosis of human T-lymphoma cells. *Cell Calcium*, 27(6), 315–328. <https://doi.org/10.1054/ceca.2000.0126>
- Díaz-Villaseñor, A., Hiriart, M., Cebrián, M. E., Zacarías-Castillo, R., & Ostrosky-Wegman, P. (2008). The activity of calpains in lymphocytes is glucose-dependent and is decreased in diabetic patients. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 40(3), 414–419. <https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2007.08.009>
- Donkor, I. O. (2011). Calpain inhibitors: a survey of compounds reported in the patent and scientific literature. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 21(5), 601–636. <https://doi.org/10.1517/13543776.2011.568480>
- Donkor, I. O. (2015). An updated patent review of calpain inhibitors (2012 – 2014). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 25(1), 17–31. <https://doi.org/10.1517/13543776.2014.982534>

- Donnelly, R. P., & Finlay, D. K. (2015). Glucose, glycolysis and lymphocyte responses. *Molecular Immunology*, 68(2, Part C), 513–519. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.07.034>
- Dutt, P., Croall, D. E., Arthur, J. S. C., De Veyra, T., Williams, K., Elce, J. S., & Greer, P. A. (2006). m-Calpain is required for preimplantation embryonic development in mice. *BMC Developmental Biology*, 6(1), 3. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-6-3>
- Flores-Martínez, S. E., Castro-Martínez, A. G., López-Quintero, A., García-Zapién, A. G., Torres-Rodríguez, R. N., & Sánchez-Corona, J. (2015). Análisis de asociación del SNP-63 y la variante indel-19 del gen de calpaína-10 con síndrome de ovario poliquístico en mujeres en edad reproductiva. *Cirugía y Cirujanos*, 83(1), 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.circir.2015.04.021>
- Fox, C. J., Hammerman, P. S., & Thompson, C. B. (2005). Fuel feeds function: energy metabolism and the T-cell response. *Nature Reviews Immunology*, 5(11), 844–852. <https://doi.org/10.1038/nri1710>
- Gartner, L., & Hiatt, J. (2002). *Texto Atlas de Histología* (2° Edición). Philadelphia: McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES.
- Glucose Uptake Assay Kit (Colorimetric) (ab136955) | Abcam. (s/f). Recuperado el 14 de agosto de 2018, de <https://www.abcam.com/glucose-uptake-assay-kit-colorimetric-ab136955.html>
- Green, R. E., Lewis, B. P., Hillman, R. T., Blanchette, M., Lareau, L. F., Garnett, A. T., ... Brenner, S. E. (2003). Widespread predicted nonsense-mediated mRNA decay of alternatively-spliced transcripts of human normal and disease genes. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 19 Suppl 1, i118-121.
- Grundy Scott M., Stone Neil J., Bailey Alison L., Beam Craig, Birtcher Kim K., Blumenthal Roger S., ... Yeboah Joseph. (2018). 2018 AHA/ACC/AACVPR/AAPA/ABC/ACPM/ADA/AGS/APhA/ASPC/NLA/PCNA Guideline on the Management of Blood Cholesterol: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*, 0(0), 1–25. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000625>
- Hanis, C. L., Boerwinkle, E., Chakraborty, R., Ellsworth, D. L., Concannon, P., Stirling, B., ... Bell, G. I. (1996). A genome-wide search for human non-insulin-dependent (type 2) diabetes genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 2. *Nature Genetics*, 13(2), 161–166. <https://doi.org/10.1038/ng0696-161>
- Horikawa, Y., Oda, N., Cox, N. J., Li, X., Orho-Melander, M., Hara, M., ... Bell, G. I. (2000). Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nature Genetics*, 26(2), 163–175. <https://doi.org/10.1038/79876>
- Hussain, A. M., Zhang, Q.-X., & Murray, A. G. (2005). Endothelial Cell Calpain Activity Facilitates Lymphocyte Diapedesis. *American Journal of Transplantation*, 5(11), 2640–2648. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2005.01077.x>

- Jacobs, S. R., Herman, C. E., MacIver, N. J., Wofford, J. A., Wieman, H. L., Hammen, J. J., & Rathmell, J. C. (2008). Glucose Uptake Is Limiting in T Cell Activation and Requires CD28-Mediated Akt-Dependent and Independent Pathways. *The Journal of Immunology*, *180*(7), 4476–4486. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.7.4476>
- Kumar, P., Choonara, Y. E., & Pillay, V. (2014). In Silico Affinity Profiling of Neuroactive Polyphenols for Post-Traumatic Calpain Inactivation: A Molecular Docking and Atomistic Simulation Sensitivity Analysis. *Molecules*, *20*(1), 135–168. <https://doi.org/10.3390/molecules20010135>
- Li, Yan-yan, Gong, G., Geng, H., Yang, Z., Zhou, C., Xu, J., ... Chen, A. (2015). CAPN10 SNP43 G>A gene polymorphism and type 2 diabetes mellitus in the Asian population: a meta-analysis of 9353 participants. *Endocrine Journal*, *62*(2), 183–194. <https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ14-0297>
- Li, Ying, Li, Y., Feng, Q., Arnold, M., & Peng, T. (2009). Calpain activation contributes to hyperglycaemia-induced apoptosis in cardiomyocytes. *Cardiovascular Research*, *84*(1), 100–110. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp189>
- Li, Ying, Ma, J., Zhu, H., Singh, M., Hill, D., Greer, P. A., ... Peng, T. (2011). Targeted Inhibition of Calpain Reduces Myocardial Hypertrophy and Fibrosis in Mouse Models of Type 1 Diabetes. *Diabetes*, *60*(11), 2985–2994. <https://doi.org/10.2337/db10-1333>
- Liu, T., Kishton, R. J., Macintyre, A. N., Gerriets, V. A., Xiang, H., Liu, X., ... Rathmell, J. C. (2014). Glucose transporter 1-mediated glucose uptake is limiting for B-cell acute lymphoblastic leukemia anabolic metabolism and resistance to apoptosis. *Cell Death & Disease*, *5*(10), e1470. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.431>
- Logie, L. J., Brown, A. E., Yeaman, S. J., & Walker, M. (2005). Calpain inhibition and insulin action in cultured human muscle cells. *Molecular Genetics and Metabolism*, *85*(1), 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2005.01.003>
- Łopatniuk, P., & Witkowski, J. M. (2011). Conventional calpains and programmed cell death. *Acta Biochimica Polonica*, *58*(3), 287–296.
- Ma, H., Fukiage, C., Kim, Y. H., Duncan, M. K., Reed, N. A., Shih, M., ... Shearer, T. R. (2001). Characterization and Expression of Calpain 10 A NOVEL UBIQUITOUS CALPAIN WITH NUCLEAR LOCALIZATION. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(30), 28525–28531. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100603200>
- Macintyre, A. N., Gerriets, V. A., Nichols, A. G., Michalek, R. D., Rudolph, M. C., Deoliveira, D., ... Rathmell, J. C. (2014). The Glucose Transporter Glut1 Is Selectively Essential for CD4 T Cell Activation and Effector Function. *Cell Metabolism*, *20*(1), 61–72. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.05.004>
- Maciolek, J. A., Alex Pasternak, J., & Wilson, H. L. (2014). Metabolism of activated T lymphocytes. *Current Opinion in Immunology*, *27*, 60–74. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.01.006>

- MacIver, N. J., Jacobs, S. R., Wieman, H. L., Wofford, J. A., Coloff, J. L., & Rathmell, J. C. (2008). Glucose metabolism in lymphocytes is a regulated process with significant effects on immune cell function and survival. *Journal of Leukocyte Biology*, 84(4), 949–957. <https://doi.org/10.1189/jlb.0108024>
- Mackenzie, R. W., & Elliott, B. T. (2014). Akt/PKB activation and insulin signaling: a novel insulin signaling pathway in the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 7, 55–64. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S48260>
- Marshall, C., Hitman, G. A., Partridge, C. J., Clark, A., Ma, H., Shearer, T. R., & Turner, M. D. (2005). Evidence that an Isoform of Calpain-10 Is a Regulator of Exocytosis in Pancreatic β -Cells. *Molecular Endocrinology*, 19(1), 213–224. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0064>
- Mikosik, A., Foerster, J., Jasiulewicz, A., Frąckowiak, J., Colonna-Romano, G., Bulati, M., ... Witkowski, J. M. (2013). Expression of calpain-calpastatin system (CCS) member proteins in human lymphocytes of young and elderly individuals; pilot baseline data for the CALPACENT project. *Immunity & Ageing*, 10, 27. <https://doi.org/10.1186/1742-4933-10-27>
- Mikosik, A., Jasiulewicz, A., Daca, A., Henc, I., Frąckowiak, J. E., Ruckemann-Dziurdzińska, K., ... Witkowski, J. M. (2016). Roles of calpain-calpastatin system (CCS) in human T cell activation. *Oncotarget*, 5(0). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13259>
- Miller, D. J., Adams, S. E., Hallett, M. B., & Allemann, R. K. (2013). Calpain-1 inhibitors for selective treatment of rheumatoid arthritis: what is the future? *Future Medicinal Chemistry*, 5(17), 2057–2074. <https://doi.org/10.4155/fmc.13.172>
- MISSION® shRNA Vector Maps. (s/f). Recuperado el 15 de agosto de 2018, de <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/functional-genomics-and-rnai/shrna/library-information/vector-map.html>
- Miyazaki, T., Koya, T., Kigawa, Y., Oguchi, T., Lei, X.-F., Kim-Kaneyama, J., & Miyazaki, A. (2013). Calpain and Atherosclerosis. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 20(3), 228–237. <https://doi.org/10.5551/jat.14787>
- Nikolajczyk, B. S., Jagannathan-Bogdan, M., Shin, H., & Gyrko, R. (2011). State of the union between metabolism and the immune system in type 2 diabetes. *Genes and Immunity*, 12(4), 239–250. <https://doi.org/10.1038/gene.2011.14>
- Noguchi, M., Sarin, A., Aman, M. J., Nakajima, H., Shores, E. W., Henkart, P. A., & Leonard, W. J. (1997). Functional cleavage of the common cytokine receptor γ chain (γ c) by calpain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(21), 11534–11539. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.21.11534>
- Oleszczak, B., Szablewski, L., & Pliszka, M. (2012). The effect of hyperglycemia and hypoglycemia on glucose transport and expression of glucose transporters in human

- lymphocytes B and T: An in vitro study. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 96(2), 170–178. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2011.12.012>
- Ono, Y., Saido, T. C., & Sorimachi, H. (2016). Calpain research for drug discovery: challenges and potential. *Nature Reviews Drug Discovery*, advance online publication. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.212>
- Ono, Y., & Sorimachi, H. (2012). Calpains — An elaborate proteolytic system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1824(1), 224–236. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.08.005>
- Ort, T., Voronov, S., Guo, J., Zawalich, K., Froehner, S. C., Zawalich, W., & Solimena, M. (2001). Dephosphorylation of β 2-syntrophin and Ca^{2+}/μ -calpain-mediated cleavage of ICA512 upon stimulation of insulin secretion. *The EMBO Journal*, 20(15), 4013–4023. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.15.4013>
- Otani, K., Han, D.-H., Ford, E. L., Garcia-Roves, P. M., Ye, H., Horikawa, Y., ... Polonsky, K. S. (2004). Calpain System Regulates Muscle Mass and Glucose Transporter GLUT4 Turnover. *Journal of Biological Chemistry*, 279(20), 20915–20920. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400213200>
- Otani, K., Polonsky, K. S., Holloszy, J. O., & Han, D.-H. (2006). Inhibition of calpain results in impaired contraction-stimulated GLUT4 translocation in skeletal muscle. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 291(3), E544–E548. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00510.2005>
- Pánico, P., Salazar, A. M., Burns, A. L., & Ostrosky-Wegman, P. (2014). Role of Calpain-10 in the Development of Diabetes Mellitus and Its Complications. *Archives of Medical Research*, 45(2), 103–115. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2014.01.005>
- Paul, D. S., Harmon, A. W., Winston, C. P., & Patel, Y. M. (2003). Calpain facilitates GLUT4 vesicle translocation during insulin-stimulated glucose uptake in adipocytes. *Biochemical Journal*, 376(3), 625–632. <https://doi.org/10.1042/bj20030681>
- Piątkiewicz, P., Czech, A., & Tatoń, J. (2007). Glucose transport in human peripheral blood lymphocytes influenced by type 2 diabetes mellitus. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 55(2), 119–126. <https://doi.org/10.1007/s00005-007-0015-9>
- Pietsch, M., Chua, K. C. H., & Abell, A. D. (2010). Calpains: attractive targets for the development of synthetic inhibitors. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 10(3), 270–293.
- Ross, M. H., & Wojciech, P. (2012). *Atlas de Histología Descriptiva* (6th edition). Philadelphia: Médica Panamericana.
- Rosser, B. G., & Gores, G. J. (2000). Cellular In Vivo Assay of Calpain Activity Using a Fluorescent Substrate. En J. S. Elce (Ed.), *Calpain Methods and Protocols* (pp. 245–259). Totowa, NJ: Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-050-0:245>
- Rouillard, A. D., Gundersen, G. W., Fernandez, N. F., Wang, Z., Monteiro, C. D., McDermott, M. G., & Ma'ayan, A. (2016). The harmonizome: a collection of

- processed datasets gathered to serve and mine knowledge about genes and proteins. *Database: The Journal of Biological Databases and Curation*, 2016. <https://doi.org/10.1093/database/baw100>
- Sato, Y., Kuwajima, M., Kamiya, H., & Harashima, H. (2003). Calpain 10 as a Predictive Gene for Type 2 Diabetes: Evidence from a Novel Screening System Using White Blood Cells of Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) Rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26(12), 1765–1768. <https://doi.org/10.1248/bpb.26.1765>
- Senemar, S., Edraki, M. R., & Toosi, S. (2016). Association between type 2 diabetes mellitus, biochemical factors and UCSNP-43 polymorphisms of CALPIN-10 gene in patients with atherosclerosis of coronary artery disease in Southern Iran population. *Journal of Cardiovascular and Thoracic Research*, 8(1), 13–19. <https://doi.org/10.15171/jcvtr.2016.03>
- Shanmuga Sundaram, J., Mohana Rao, V., Meena, A. K., & Anandaraj, M. P. J. S. (2006). Altered expression, intracellular distribution and activity of lymphocyte calpain II in Duchenne muscular dystrophy. *Clinica Chimica Acta*, 373(1–2), 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2006.05.004>
- Shinkai-Ouchi, F., Koyama, S., Ono, Y., Hata, S., Ojima, K., Shindo, M., ... Sorimachi, H. (2016). Predictions of Cleavability of Calpain Proteolysis by Quantitative Structure-Activity Relationship Analysis Using Newly Determined Cleavage Sites and Catalytic Efficiencies of an Oligopeptide Array. *Molecular & Cellular Proteomics*, 15(4), 1262–1280. <https://doi.org/10.1074/mcp.M115.053413>
- Shiny, A., Bibin, Y. S., Shanthirani, C. S., Regin, B. S., Anjana, R. M., Balasubramanyam, M., ... Mohan, V. (2014). Association of Neutrophil-Lymphocyte Ratio with Glucose Intolerance: An Indicator of Systemic Inflammation in Patients with Type 2 Diabetes. *Diabetes Technology & Therapeutics*, 16(8), 524–530. <https://doi.org/10.1089/dia.2013.0264>
- Siklos, M., BenAissa, M., & Thatcher, G. R. J. (2015). Cysteine proteases as therapeutic targets: does selectivity matter? A systematic review of calpain and cathepsin inhibitors. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5(6), 506–519. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.08.001>
- Smith, M. A., McInnes, C., Whitaker, R. M., Lindsey, C. C., Comer, R. F., Beeson, C. C., & Schnellmann, R. G. (2012). Calpain 10 Homology Modeling with CYGAK and Increased Lipophilicity Leads to Greater Potency and Efficacy in Cells. *ACS chemical biology*, 7(8), 1410–1419. <https://doi.org/10.1021/cb300219h>
- Sorimachi, H., Hata, S., & Ono, Y. (2011). Calpain chronicle--an enzyme family under multidisciplinary characterization. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, 87(6), 287–327.
- Sorimachi, H., Mamitsuka, H., & Ono, Y. (2012). Understanding the substrate specificity of conventional calpains. *bchm*, 393(9), 853–871. <https://doi.org/10.1515/hsz-2012-0143>

- Sreenan, S. K., Zhou, Y.-P., Otani, K., Hansen, P. A., Currie, K. P. M., Pan, C.-Y., ... Polonsky, K. S. (2001). Calpains Play a Role in Insulin Secretion and Action. *Diabetes*, 50(9), 2013–2020. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.9.2013>
- Stentz, F. B., & Kitabchi, A. E. (2003). Activated T lymphocytes in Type 2 diabetes: implications from in vitro studies. *Current Drug Targets*, 4(6), 493–503.
- Stifanese, R., Averna, M., De Tullio, R., Salamino, F., Cantoni, C., Mingari, M. C., ... Melloni, E. (2008). Role of the calpain–calpastatin system in the density-dependent growth arrest. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 479(2), 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.09.002>
- Svensson, L., McDowall, A., Giles, K. M., Stanley, P., Feske, S., & Hogg, N. (2010). Calpain 2 Controls Turnover of LFA-1 Adhesions on Migrating T Lymphocytes. *PLOS ONE*, 5(11), e15090. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015090>
- Takeda, Y., & Wakabayashi, I. (2012). Alteration in lymphocyte population and humoral immune response in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Life Sciences*, 90(13–14), 545–552. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2012.01.019>
- Trajkovski, M., Mziaut, H., Altkrüger, A., Ouwendijk, J., Knoch, K.-P., Müller, S., & Solimena, M. (2004). Nuclear translocation of an ICA512 cytosolic fragment couples granule exocytosis and insulin expression in β -cells. *The Journal of Cell Biology*, 167(6), 1063–1074. <https://doi.org/10.1083/jcb.200408172>
- Trajkovski, M., Mziaut, H., Schubert, S., Kalaidzidis, Y., Altkrüger, A., & Solimena, M. (2008). Regulation of Insulin Granule Turnover in Pancreatic β -Cells by Cleaved ICA512. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(48), 33719–33729. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804928200>
- Turner, M. D., Cassell, P. G., & Hitman, G. A. (2005a). Calpain-10: from genome search to function. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 21(6), 505–514. <https://doi.org/10.1002/dmrr.578>
- Turner, M. D., Cassell, P. G., & Hitman, G. A. (2005b). Calpain-10: from genome search to function. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 21(6), 505–514. <https://doi.org/10.1002/dmrr.578>
- Turner, M. D., Fulcher, F. K., Jones, C. V., Smith, B. T., Aganna, E., Partridge, C. J., ... Patel, Y. M. (2007). Calpain facilitates actin reorganization during glucose-stimulated insulin secretion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 352(3), 650–655. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.11.077>
- Wofford, J. A., Wieman, H. L., Jacobs, S. R., Zhao, Y., & Rathmell, J. C. (2008). IL-7 promotes Glut1 trafficking and glucose uptake via STAT5-mediated activation of Akt to support T-cell survival. *Blood*, 111(4), 2101–2111. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-06-096297>
- Yajima, Y., Sato, M., Sorimachi, H., Inomata, M., Maki, M., & Kawashima, S. (2006). Calpain System Regulates the Differentiation of Adult Primitive Mesenchymal ST-

- 13 Adipocytes. *Endocrinology*, 147(10), 4811–4819.
<https://doi.org/10.1210/en.2005-1647>
- Yan, S.-T., Li, C.-L., Tian, H., Li, J., Pei, Y., Liu, Y., ... Sun, B.-R. (2014). Association of calpain-10 rs2975760 polymorphism with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 7(10), 3800–3807.
- Yang, M., Zhang, Y., Pan, J., Sun, J., Liu, J., Libby, P., ... Shi, G.-P. (2007). Cathepsin L activity controls adipogenesis and glucose tolerance. *Nature Cell Biology*, 9(8), 970–977. <https://doi.org/10.1038/ncb1623>
- Yusuf, I., & Fruman, D. A. (2003). Regulation of quiescence in lymphocytes. *Trends in Immunology*, 24(7), 380–386. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(03\)00141-8](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(03)00141-8)
- Zatz, M., & Starling, A. (2005). Calpains and Disease. *New England Journal of Medicine*, 352(23), 2413–2423. <https://doi.org/10.1056/NEJMra043361>
- Zhang, H., Yang, Z., Zhang, W., Niu, Y., Li, X., Qin, L., & Su, Q. (2017). White blood cell subtypes and risk of type 2 diabetes. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 31(1), 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2016.10.029>
- Zhou, Y.-P., Sreenan, S., Pan, C.-Y., Currie, K. P. M., Bindokas, V. P., Horikawa, Y., ... Polonsky, K. S. (2003). A 48-hour exposure of pancreatic islets to calpain inhibitors impairs mitochondrial fuel metabolism and the exocytosis of insulin. *Metabolism - Clinical and Experimental*, 52(5), 528–534. <https://doi.org/10.1053/meta.2003.50091>