

Universidad Peruana Cayetano Heredia  
Facultad de Ciencias y Filosofía “Alberto Cazorla Talleri”



## **CONSTRUCCIÓN DE PROTEÍNA QUIMÉRICA DE PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE Y CALPAÍNA 10**

Lucía Alana Rojas Meza

Tesis para optar por el Título de Licenciada en Biología

Unidad de Biomedicina  
Facultad de Estudios Superiores de Iztacala  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Estado de México, México

2019

## AGRADECIMIENTOS

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM IN223116. Proyecto 'Interacciones proteína-proteína de los canales de sodio dependientes de voltaje'. Agradezco a la UNAM la beca recibida.

## ÍNDICE

I.	Introducción	1
	1.1 Clasificación, estructura y función de las calpaínas	1
	1.2 Papel de las calpaínas en la fisiología neuronal y en los procesos neurodegenerativos	2
	1.3 Los canales NaV podrían ser un blanco de la calpaína 10 durante la hiperglucemia	4
II.	Objetivos	7
	2.1 Objetivo general	7
	2.2 Objetivos específicos	7
III.	Materiales y métodos	8
	3.1 Diseño de primers	8
	3.2 PCR	8
	3.3 PCR, ligación y amplificación	9
	3.4 Cultivo celular	10
	3.5 Transfección transitoria de células N1E-115	10
	3.6 Estandarización de la transfección	11
	3.7 Extracción y cuantificación de proteínas totales	11
	3.8 Ensayo de western blot	12
IV.	Resultados	12
	4.1 Diseño del Constructo	12
	4.2 Construcción y análisis del plásmido	14

4.3	Estandarización de la transfección	19
4.4	Identificación de la Calpaína 10 exógena	21
V.	Discusión	23
VI.	Bibliografía	28

## Resumen

Las calpaínas son proteasas dependientes de calcio de la familia de las cistein proteasas, cuya participación en enfermedades neurodegenerativas está siendo documentada y estudiada. En nuestro laboratorio se han encontrado evidencias de la interacción entre calpaína 10 y los canales de sodio dependientes de voltaje ( $\text{Na}_v$ ). Los canales  $\text{Na}_v$  son elementos clave en el proceso de la señalización neuronal, que inicia con la despolarización de la neurona con la subsecuente activación de canales dependientes de voltaje. La actividad anormal de los  $\text{Na}_v$  ha sido asociada a desórdenes de la excitabilidad y la muerte neuronal. La calpaína 10 es una calpaína atípica que es expresada en el cerebro, entre otros tejidos, la cual ha sido asociada al riesgo de padecer diabetes mellitus tipo 2. En nuestro laboratorio se ha visto también que el ARNm de la calpaína 10 es sobre expresada en neuroblastomas cuando son expuestas a altas concentraciones de glucosa. En conjunto, estos hallazgos sugieren que la calpaína 10 podría jugar un papel en las complicaciones neuropáticas asociadas a la diabetes. Por esta razón, con el fin de caracterizar mejor la interacción entre los canales de sodio y la calpaína 10, así como su posible papel en la neurodegeneración, se construyó un sistema de expresión quimérico de la calpaína 10 en fusión con la proteína verde fluorescente (EGFP), para su expresión heteróloga en células de neuroblastoma de la línea celular N1E-115, lo que emula el incremento en la expresión de calpaína 10 observado en hiperglucemia. El constructo se verificó por secuenciación y la sobre expresión de la calpaína 10 fue verificada por inmunodetección posterior a la transfección de las células de neuroblastoma.

## **Abstract**

Calpains are calcium-dependent proteases, which role in neurodegenerative disease is actively studied. In our laboratory we have found evidence of the interaction between calpain 10 and Na<sub>v</sub>. This channels are key elements in the process of neuronal signaling, which starts with the depolarization of the neuron with the subsequent activation of the voltage-gated channels. The abnormal activity of Na<sub>v</sub> has been associated with neuronal excitability disorders and neuronal death. Calpain 10 is an atypical calpain, which is expressed in the brain, and has been associated with diabetes mellitus type 2. Interestingly, we have also found that calpain 10 mRNA is expressed in neuroblastoma when cultured in high concentrations of glucose. Altogether, these findings suggest that the interaction between calpain 10 and Na<sub>v</sub> may have a role in the neuropathic complications associated to diabetes. In order to further characterize the interaction of calpain 10 with Na<sub>v</sub> and its possible role in neurodegeneration, a chimeric expression system for calpain 10 fused to the green fluorescent protein (EGFP) was constructed and its expression was tested in the neuroblastoma cell line N1E-115. Overexpression of Calpain 10 emulates the rise observed in hyperglycemia. The construct was verified by sequencing and the over expression of calpain 10 was verified by immunodetection after transfection of neuroblastoma cells.

**Key words:** Calpain, Diabetic neuropathy, Neurodegeneration, Genetic engineering

## I. Introducción

### 1.1 Clasificación, estructura y función de las calpaínas

Las calpaínas son proteasas no lisosomales activadas por calcio [1, 2, 3, 4]. Tienen funciones en diferentes procesos celulares como apoptosis, migración celular, y cambios en el citoesqueleto involucrados en el desarrollo embrionario, desarrollo del sistema nervioso central y mantenimiento de vías involucradas en funciones cognitivas y desarrollo de memoria a largo plazo, entre otros [5, 6, 7, 8, 9]. La regulación de la actividad de las calpaínas es importante para la función celular dada su participación en diferentes procesos fisiológicos y porque la deficiencia de su actividad o mutaciones en su gen dan como consecuencia diversos fenotipos patológicos como por ejemplo: úlceras gástricas, en caso de mutaciones en gen de calpaína 8 y 9; distrofia muscular, por mutaciones en gen de calpaína 3; o diabetes mellitus tipo 2, por mutaciones en gen de calpaína 10, entre otros fenotipos [3, 10]. Asimismo, las calpaínas han sido implicadas en mecanismos de señalización en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer [3, 11, 12]

Existen 15 genes independientes que codifican a las calpaínas, de los cuales uno codifica a la calpaína 4, que es una subunidad auxiliar sin función catalítica *per se*. Por su estructura, las calpaínas se clasifican como típicas o atípicas. Las calpaínas típicas son heterodiméricas, constituidas por una unidad regulatoria, la subunidad de calpaína 4, y una unidad principal. La unidad principal contiene 4 dominios: el dominio I es el extremo N-terminal, el dominio II contiene el sitio activo proteolítico, el dominio III es la porción de unión a fosfolípidos de membrana y calcio y el dominio IV es el extremo C-terminal que contiene motivos de unión al calcio y que permiten la formación del heterodímero entre las dos subunidades. Las atípicas mantienen los dominios I y II, pero no todas tienen el dominio III y IV de unión a la subunidad regulatoria y otras sustituyen el dominio IV por una versión del extremo C-terminal [2, 3]. En las calpaínas típicas 1 y 2 el extremo N-terminal es auto protealizado [13, 14], lo que aumenta su afinidad por el calcio, aumentando así su actividad proteolítica [13], asimismo, la asociación del dominio III con fosfolípidos también aumenta su afinidad por el calcio incrementando su actividad [2]. En el caso de las calpaínas atípicas no está claro si el

extremo N-terminal es autoproteolizado, sin embargo, se sabe que la calpaína 2 puede proteolizar el N-terminal de la calpaína 10 *in vitro* [15].

La proteólisis mediada por calpaínas es particular y diferente a otros sistemas y componentes proteolíticos intracelulares como proteosomas, fagosomas y caspasas, en el sentido de que no degrada a sus blancos. Las calpaínas hacen uno a tres cortes, separando dominios completos, lo que modifica la actividad de sus sustratos [2, 16, 17]. Aunque a la fecha no se ha identificado una secuencia de aminoácidos consenso, existen secuencias de aminoácidos preferentes en los sitios de corte de los sustratos de las calpaínas; sin embargo, se cree que las calpaínas pueden reconocer elementos estructurales de orden superior como la estructura secundaria del sustrato, el cual es procesado proteolíticamente sin ser degradado completamente [4, 18, 19]. Además de la autoproteólisis y el calcio, su actividad es regulada por la calpastatina un inhibidor citosólico, específico para las calpaínas, distribuido de manera ubicua. Sin embargo, la regulación de la interacción calpaína-calpastatina, que se da en el citosol, no está plenamente entendida [10].

A la fecha se conocen cerca de 200 sustratos para las diferentes calpaínas, aunque se calcula que en realidad podría haber de más de 1000 blancos [3, 14]. Algunos ejemplos de los sustratos de las calpaínas incluyen: proteínas asociadas a membrana y a citoesqueleto, como receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), receptor de rianodina,  $\beta$ -integrinas, aquaporinas, transportadores; y proteínas involucradas en la transducción de señales [2, 16, 20]. En neuronas se ha visto que la activación de calpaínas en modelos de lesión cerebral pueden desorganizar los dominios submembranales donde se encuentran las proteínas responsables de la excitación celular, ya que varias de estas proteínas son blanco de la calpaína 1 o 2 incluyendo: ankirinas, espectrina y canales de sodio dependientes de voltaje [21]

## 1.2 Papel de las calpaínas en la fisiología neuronal y en los procesos neurodegenerativos

En el sistema nervioso (SN) las calpaínas tienen roles importantes, directos e indirectos, en la fisiología neuronal. Las calpaínas más estudiadas son las calpaínas 1 y 2, las cuales participan en mecanismos de generación de la potenciación a largo plazo,



proceso necesario para la consolidación de la memoria y el aprendizaje. En la transmisión sináptica, la proteólisis mediada por calpaínas 1 y 2 regulan el número de receptores ionotrópicos y metabotrópicos de glutamato, lo que a su vez modifica el influjo de calcio en la posinapsis y consecuentemente la excitabilidad [22, 23]. Por ello, se ha sugerido que la proteólisis de los receptores NMDA por calpaínas es parte de los mecanismos de neuroprotección contra el daño por excitotoxicidad [23, 24]. Otro proceso neuronal en el que se han visto implicadas las calpaínas 1 y 2 es en el remodelamiento de la morfología dendrítica, por su asociación a los receptores NMDA y por degradación de espectrina, actina, microtúbulos y neurofilamentos [25, 26, 27].

Por otro lado, existen evidencias de que las calpaínas participan en la muerte neuronal por excitotoxicidad y en otros procesos neurodegenerativos [26]. La neurodegeneración se caracteriza por una pérdida en la función neuronal con la consecuente disminución de la comunicación entre neuronas. En algunas enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, esclerosis múltiple, isquemia cerebral y daño traumático, se ha observado una sobreactivación de las calpaínas como parte de los mecanismos patofisiológicos que conllevan ya sea a la muerte celular programada o a la necrosis relacionados a dichas enfermedades [11, 28, 29, 30]. Por esto se ha propuesto que las calpaínas pueden ser un blanco terapéutico en los procesos neurodegenerativos [31]. Aunque hasta ahora sólo han sido involucradas las calpaínas 1 y 2 en procesos neurodegenerativos, en el cerebro se expresan también las calpaínas 5, 7 y 10, de las cuales no hay muchos estudios y no está clara si participan o no en la neurodegeneración [32, 33].

Otro blanco importante de las calpaínas en las neuronas son los canales  $Na_v$ . Los  $Na_v$  son proteínas cruciales para la generación y propagación de potenciales de acción a través del axón. A través de sus dominios intracelulares pueden interactuar con proteínas reguladoras y de anclaje [34]. Cabe resaltar que, los cambios en la actividad de los canales  $Na_v$  han sido ligados a desórdenes de la excitabilidad neuronal y la muerte celular [35, 36, 37]. En modelos de lesión cerebral se ha visto que los canales  $Na_v$  son proteolizados, y que dicha proteólisis se puede prevenir mediante el uso de inhibidores de calpaínas [38, 39]. Asimismo, en preparaciones de membranas aisladas,

se ha visto que los canales  $\text{Na}_v$  1.2 pueden ser proteolizados por calpaina 1 purificada [40]. Evidencias adicionales con células HEK293 transfectadas con el canal  $\text{Na}_v$  1.6, muestran que este canal también es blanco de las calpaínas, y que la proteólisis del canal altera la corriente de sodio [41]. Es preciso destacar que en los modelos de lesión la concentración de calcio intracelular incrementa lo suficiente para activar calpaínas 1 y 2, aunque tampoco en estos modelos se han hecho estudios que indaguen si las calpaínas 5, 7 y 10 son activadas.

En enfermedades neurodegenerativas como epilepsia, dolor, esclerosis múltiple y neuropatías diabéticas, así como procesos de anoxia o daño celular un fenómeno predominante son los cambios en la corriente de los canales  $\text{Na}_v$  [42, 43, 44]. En modelos de lesiones de la espina dorsal hay un incremento de la corriente de sodio persistente, (i.e. la corriente residual después de que la mayoría de los canales se han inactivado), que contribuye al desarrollo de la espasticidad en esta lesión, lo que se ha asociado a proteólisis de canales de sodio por calpaínas [41]. Además de los cambios en la corriente, se ha propuesto que la actividad de las calpaínas puede regular también la expresión de los  $\text{Na}_v$  en la superficie celular, como ocurre con la expresión de  $\text{Na}_v$  1.7 en células cromafines [45]. Otra posibilidad es que la proteólisis de los canales de sodio sea un mecanismo de regulación transcripcional, como se ha visto con  $\text{Na}_v$  1.5 [46]. Cabe señalar que en la mayoría de los estudios realizados con respecto a la proteólisis de canales en modelos de lesión espinal o cerebral, no es posible distinguir cuales calpaínas son responsables de la proteólisis porque los inhibidores de calpaínas no distinguen las diferentes isoformas.

### 1.3 Los canales $\text{Na}_v$ podrían ser un blanco de la calpaína 10 durante la hiperglucemia

En nuestro laboratorio se ha observado que la calpaína 10 interactúa con las isoformas de los  $\text{Na}_v$  1.1, 1.2 y 1.6 *in vitro* e *in vivo* en pruebas de interacción proteína-proteína GST-pull down y sistema de doble híbrido en levadura [47].

La calpaína 10 es una calpaína atípica de expresión ubicua. En la rata está principalmente expresada en el cerebro, mientras que en humano es más abundante en el corazón [48, 49]. La calpaína 10 ha sido blanco de estudio en el campo de la diabetes porque en muchos estudios se ha encontrado una asociación entre variantes

del gen de la calpaína 10 con un incremento en el riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2 en diferentes poblaciones [48, 50-59].

En la diabetes mellitus tipo 2 existen complicaciones en las que se han identificado mecanismos neurodegenerativos, llamadas neuropatías diabéticas [60]. Los daños a los nervios en pacientes diabéticos pueden darse ya sea en nervios periféricos autonómicos, afectando a un nervio en particular (daño mononeuropático), o afectar incluso el músculo (daño amiotrófico) [60]. Una de las razones propuestas de la generación de dolor en las neuropatías y su patogénesis es que el daño hiperglicémico a los nervios causa el brote de nuevos nervios expandiendo el área sensibilizada causando hiperexcitabilidad generada por impulsos ectópicos dado por la expresión anormal de isoformas de los  $Na_v$  [61, 62], proceso en el cual la acción de las calpaínas sobre la remodelación del citoesqueleto [25, 26, 27] podrían jugar un papel relevante. Por otro lado también se ha visto que la expresión y actividad de algunas isoformas de los  $Na_v$ , como  $Na_v$  1.3 y 1.7, están alteradas, y que el funcionamiento anómalo de estos canales es importante para el desarrollo de las neuropatías diabéticas [63, 64, 65]. Como se mencionó anteriormente, la proteólisis por calpaínas también podría estar involucrada en el funcionamiento anómalo de estos canales.

Las calpaínas se han asociado a la patogénesis de la degeneración axonal en estas neuropatías diabéticas [66]. Kharatmal, S. B. y otros (2015) han visto el uso de un inhibidor de calpaínas mitiga los efectos neurodegenerativos en neuronas de la raíz del ganglio dorsal de ratas con diabetes, incluyendo marcadores de estrés oxidativo, neuroinflamación y alteración de la corriente de sodio resistente a tetrodoxina [66].

Por otra parte, la asociación de la diabetes con la neurodegeneración ha sido extensamente estudiado, se han encontrado asociaciones entre la diabetes con declive cognitivo, cambios cerebrovasculares, atrofia cerebral y con la patología de la enfermedad del Alzheimer [67].

Asimismo, se ha estudiado la asociación de la enfermedad del Alzheimer como una complicación neuropatológica de la diabetes mellitus tipo 2 [68]. En pacientes diabéticos se ha observado un mayor riesgo de padecer la enfermedad de Alzheimer frente a individuos saludables, así como una mayor disfunción cognitiva; y en modelos

animales de diabetes, una alteración de la plasticidad sináptica neuronal del hipocampo [69, 70]. Las calpaínas parecen estar involucradas en los procesos patofisiológicos de ambas enfermedades, se ha visto a la calpaína 1 sobre activada en cerebros de pacientes con diabetes, pacientes con Alzheimer y en pacientes con ambos, diabetes y Alzheimer, siendo mayor la sobre activación en éstos últimos [71].

La calpaína 10 también puede estar involucrada en ambas patologías. Se ha visto sobre expresada en astrocitos de muestras de cerebros post-mortem con lesiones neuropatológicas tipo Alzheimer [72], lo que muestra su posible participación en procesos neurodegenerativos. Además, se ha visto que el ARNm de la calpaína 10 se eleva en células de neuroblastoma en respuesta al aumento de glucosa [73], lo que da pie a preguntarse si la calpaína 10 contribuye al desarrollo patofisiológico de las neuropatías diabéticas.

Aunque se desconoce si y cómo la calpaína 10 podría inducir la muerte neuronal esta isoforma se ha visto involucrada en procesos de muerte celular en células pancreáticas, en células renales y en degeneración retinal [74, 75, 76]. Cabe mencionar, sin embargo, que incluso en estos casos no está claro todavía el mecanismo por el cual la calpaína 10 produce la muerte celular. Algunos estudios sugieren que la calpaína 10 podría tener un importante efecto sobre la actividad mitocondrial. Por ejemplo, Arrington *et al.* (2006) observaron que en mitocondrias renales, la sobre expresión de la calpaína 10 proteoliza complejos proteicos de la cadena respiratoria, y propusieron que la hinchazón mitocondrial y la apoptosis estaban asociadas a disfunción mitocondrial inducida por calcio a través de la calpaína 10 [77]. En contraste, Covington MD & Schnellmann RG (2012) y Smith MA *et al.* (2012) en las células renales vieron que la exposición crónica a niveles altos de azúcar causa la disminución de la expresión de la calpaína 10 en mitocondria, así como la acumulación de sus sustratos en la matriz mitocondrial, y es esto lo que contribuye a la muerte celular y a la disfunción mitocondrial [75, 78]. No obstante, se ha visto sobre expresión de calpaína 10 en islotes pancreáticos de pacientes con diabetes tipo 2 [79] por lo que podrían existir diferentes mecanismos de regulación de expresión de la calpaína 10 en condiciones hiperglicémicas. Más aun, en nuestro laboratorio hemos

visto aumento de calpaína 10 en neuroblastomas tratados en condiciones hiperglicémicas, por tanto es posible pensar que puede existir un mecanismo de regulación diferente en el sistema nervioso. En conjunto, estos estudios indican que una alteración en los niveles de la calpaína 10, sea aumento o disminución, fuera de los niveles fisiológicos puede causar muerte celular.

En síntesis, la calpaína 10 tiene un posible rol en neuropatías diabéticas y en procesos neurodegenerativos como Alzheimer. Asimismo, su interacción con varias isoformas de  $Na_v$  genera varias preguntas sobre su rol en mecanismos de regulación de los mismos y, más aun, sobre su rol en mecanismos neurodegenerativos en los que pueden o no estar involucrados los  $Na_v$ . El esclarecimiento de la actividad de la calpaína 10 sobre proteínas como los  $Na_v$ , ayudaría a elucidar mecanismos de neurodegeneración en dónde la calpaína 10 está involucrada, abriendo posibilidad de nuevos blancos terapéuticos en enfermedades neurodegenerativas. Además, su estudio sería útil para elucidar su rol en otros mecanismos de muerte celular y en otras patologías en las que se han visto involucradas las calpaínas [80]. Debido a que normalmente, en las neuronas no se puede diferenciar la actividad de las calpaínas 1 y 2 de otras calpaínas, se planteó la necesidad de producir un sistema de expresión heteróloga, que permita expresar o sobreexpresar a la calpaína 10. Esta herramienta permitirá caracterizar mejor la interacción entre los canales de sodio y, en el futuro próximo, estudiar del rol de la calpaína 10 en neurodegeneración.

## **II. Objetivos**

### **2.1 Objetivo general**

- Construir proteína quimérica de proteína verde fluorescente con calpaína 10 y verificar su sobre expresión en células de neuroblastomas N1E-115.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Diseñar oligonucleótidos específicos para amplificar la secuencia codificante de la calpaína 10 mediante análisis de la secuencia de nucleótidos del genoma de

*Mus musculus* publicada en la base de datos genética del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

- Amplificar la secuencia codificante de la calpaína 10 mediante PCR
- Clonar la calpaína 10 en el vector pEGFP-C1
- Verificar el constructo en el pEGFP-C1 mediante análisis por secuenciación.
- Transfectar el vector pEGFP-C1 con la calpaína incorporada en células de neuroblastoma N1E-115.
- Verificar la sobre expresión cualitativa de la calpaína 10 mediante inmuno detección.

### III. Materiales y métodos

#### 3.1 Diseño de primers

A partir de la secuencia del ADNc de la calpaína 10 del genoma de *Mus musculus* publicada en la base de datos genética del National Center for Biotechnology Information (NCBI) con acceso NM\_011796.2, se analizó y verificó el marco abierto de lectura (ORF) de la calpaína en la plataforma virtual Biology workbench del San Diego Supercomputer Center (<http://workbench.sdsc.edu/>) para la adición de sitios de restricción convenientes en el diseño de los primers, de acuerdo al marco de lectura de la proteína verde fluorescente EGFP del plásmido pEGFP-C1 (Fig. 1), de manera que la calpaína y la proteína EGFP siguieran un mismo marco de lectura. Para los primers se utilizaron las enzimas EcoRI y BamHI, cuyos sitios de restricción se encuentran en el sitio de clonación múltiple del pEGFP-C1 pero no en la secuencia codificante de la calpaína 10. Los primers fueron evaluados en las plataformas virtuales de Primer Blast del NCBI y OligoAnalyzer 3.1 de Integrated DNA Technologies.

#### 3.2 PCR

A partir de ADNc de ratón aislado previamente en el laboratorio a partir de ARNm de cerebro de ratón, se amplificó la secuencia de la calpaína 10 con los oligonucleótidos diseñados siguiendo el siguiente protocolo: desnaturalización del ADNc a 95 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización del ADNc a 95 °C por 30 seg, hibridación

de los primers a 63 °C por 30 seg y elongación a 72 °C por 2 min. En el último ciclo, elongación a 72 °C por 5 min. El producto de la PCR, así como los productos de digestión y ligación, se identificaron y purificaron a partir de geles de agarosa 0.8% en buffer TAE (40 mM Tris-Ácido acético/ 1mM EDTA).

### **3.3 PCR, ligación y amplificación**

El amplicón obtenido en la PCR y el pEGFP-C1 se digirieron con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI correspondientes a los sitios de restricción agregados en los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de la calpaína 10 y presentes en el sitio de clonación múltiple del pEGFP-C1. El pEGFP se desfosforiló utilizando fosfatasa alcalina de intestino de ternero (CIAP, Invitrogen) a 37 °C, para evitar su re-circularización y se ligó el plásmido desfosforilado con el ADNc de calpaína predigerida, utilizando la ligasa de ADN T4 (Invitrogen) en el buffer del fabricante, a 16 °C. El producto de ligación se usó para transformar bacterias *E. coli* DH5α por choque térmico por 45 segundos a 42 °C. Las bacterias se cultivaron en medio LB suplementado con kanamicina 30 µg/ml. Sólo las bacterias que adquirieron el plásmido fueron capaces de sobrevivir en este medio debido al marcador de selección incluido en el vector. Se seleccionaron 4 colonias, que se subcultivaron en medio LB/kanamicina por 12 h y finalmente se extrajeron los plásmido de varias colonias, utilizando el kit ZR Plasmid Miniprep (Zymo Research). Para identificar aquellas clonas que poseían el constructo deseado se usó la enzima Bgl II. Posteriormente los plásmidos seleccionados se verificaron por secuenciación Sanger. Para la secuenciación se diseñaron los siguientes primers que flanquean el sitio de clonación múltiple. Primer forward: 5' GACCGCCGCCGGGATCACTCTC. Primer reverse: 5' AACCTCTACAAATGTGGTATG.

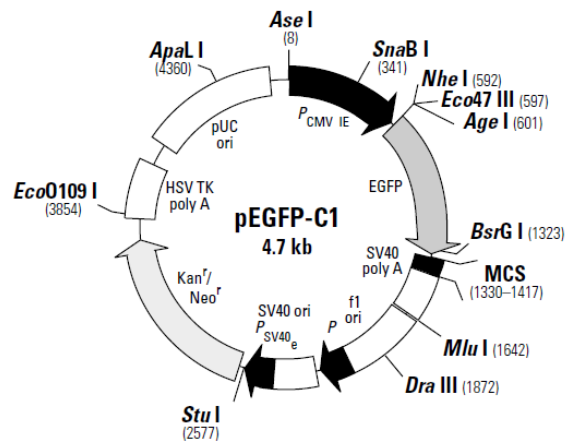


Figura 1. Vector pEGFP-C1 utilizado para expresión en células de mamífero.

### 3.4 Cultivo celular

Se usó la línea celular N1E-115, la cual es una línea celular adrenérgica proveniente del neuroblastoma de ratón, permite transfecciones heterólogas y es adecuada para el objetivo del trabajo porque expresa calpaína 10 y canales de sodio dependientes de voltaje de manera nativa. Las N1E-115 son células adherentes con un tiempo de duplicación de 36 horas aproximadamente. Las células fueron sembradas a partir de un cultivo madre subcultivado a su vez de un vial proveniente de la American Type Culture Collection (ATCC) en el segundo pasaje. Las células se utilizaron entre los pasajes 15 y 20.

Tanto el matraz madre como los cultivos experimentales se cultivaron en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado (medio completo) con: 10% de suero fetal bovino, 2mM L-glutamina y Penicilina/Estreptomina (GIBCO Invitrogen) a 37 °C y mantenidas en una atmosfera con 95% de humedad y 5% CO<sub>2</sub>.

### 3.5 Transfección transitoria de células N1E-115

Los cultivos experimentales se sembraron en placas multipozo de 6 pozos con un área de 3.79 cm<sup>2</sup> con 5 ml de cultivo en medio completo por 24 h antes de la transfección. Las células se transfectaron con plásmido pEGFP-C1 o pEGFP-Calp10 mediante lipofección utilizando Lipofectamine™ (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Previo a la transfección, se retiró el medio de cultivo DMEM de los pozos y



se sustituyó por un volumen 50% menor al inicial en el pozo con medio DMEM sin suplementar. Este paso es necesario porque el suero fetal interfiere con la formación y estabilidad de los complejos lipofectamina/ADN durante la transfección. El complejo lipofectamina/ADN fue agregado a los pozos e incubado por 3 horas. Finalmente, se añadió un volumen al pozo de medio DMEM doblemente suplementado (20% suero) y se incubaron las células por 48h más. Posteriormente, se verificó la expresión de la proteína EGFP en las células con un microscopio de epifluorescencia y se tomaron fotografías para el cálculo del porcentaje de transfección. También se hicieron extracciones de proteínas para determinar la expresión de calpaína 10.

### **3.6 Estandarización de la transfección**

Para la optimización de las condiciones de transfección se estandarizaron la densidad celular en las placas de sembrado y el ratio ADN:lipofectamina para la transfección. Inicialmente, se buscó ajustar la densidad celular, por lo que se sembraron las células N1E-115 a densidades de 60 000, 120 000 y 240 000 células por duplicado en 5 mL de medio de cultivo y fueron incubadas 24h previa la transfección. También se estandarizó el ratio ADN:lipofectamina (ug:uL) usando 0.8 ug de plásmido con 1.6, 3.2 y 6.4 uL de Lipofectamine<sup>TM</sup> (Invitrogen) lo que da proporciones de 1:2, 1:4 y 1:8, respectivamente.

### **3.7 Extracción y cuantificación de proteínas totales**

Las células se lavaron con un tampón de sales de fosfato (PBS, por sus siglas en inglés, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7.4 pH) suplementado con 2mM EDTA. Las células se recolectaron y resuspendieron en 250 uL de buffer RIPA (NaCl 140 mM, TrisHCl pH 8.0 10 mM, EDTA 1 mM, Tritón X-100 1%, desoxicolato de sodio 0.1%, SDS 0.01% y EGTA 0.5 mM) en hielo. Se utilizó el sonicador SONIC-150W Ultrasonic Cell Crusher y se sonicó el lisado a 30 W tres veces por 2 segundos en hielo. Se realizó el ensayo de Bradford (Biorad) para su cuantificación utilizando muestras estándares. Además, los lisados totales en buffer RIPA se utilizaron para verificar la integridad de las proteínas por electroforesis.

### **3.8 Ensayo de Western blot**

Las muestras de proteínas de N1E-115 se corrieron en geles de acrilamida 8% y las proteínas se separaron por electroforesis (SDS-PAGE) a 0.04 A por 2 horas. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF 0.45 µm por electrotransferencia en cámara húmeda a 300 mA por 2 horas, en buffer de Towbin (Tris 29 mM, glicina 192 mM, SDS 0.5% y metanol 20%) (Bulletin 6211, Biorad). La membrana de PVDF se bloqueó durante 2 horas en solución de bloqueo (PBS/leche desgrasada 4%). Para la inmunodetección se utilizó el anticuerpo específico Calpain 10 de cabra (Santa Cruz Biotechnology, sc-48454) el cual se diluyó en solución de bloqueo 1:10000, y se incubó por 2 h. Posteriormente se hicieron 3 lavados con PBS/Tween 0.1% de 10 min cada uno. Las membranas se incubaron por una hora con el anticuerpo secundario anti-cabra acoplado a peroxidasa de rábano (HRP-donkey anti-goat, Santa Cruz Biotechnology) diluido 1:30,000 en solución de bloqueo. Finalmente se hicieron tres lavados más de 10 minutos cada uno con PBS/Tween 0.1%. Las señales se revelaron mediante una reacción de quimioluminiscencia. Las membranas se incubaron por 5 minutos usando luminol y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Finalmente, la señal se registró usando una placa fotográfica Biomax (GE Healthcare) en un cassette de autoradiografía y se reveló la placa en un cuarto oscuro con reactivos Kodak.

## **IV. Resultados**

### **4.1 Diseño del constructo**

El vector utilizado para la sobre expresión de la calpaína 10 fue el plásmido pEGFP-C1. Dicho vector contiene el promotor de citomegalovirus (CMV) el cual permite una buena transfección transitoria células de mamífero, y en particular en las células N1E-115 [86]. El vector incluye el gen de la proteína verde fluorescente, el cual quedó fusionado en el extremo N-terminal de la calpaína 10. A partir del análisis de la secuencia de la calpaína y del vector, se eligieron un par de enzimas de restricción de la secuencia de multiclonación (polylinker, Fig. 1), de manera tal que dichas enzimas no cortaran en la secuencia de la calpaína. En paralelo, se diseñaron primers a partir del gen de la calpaína 10 de forma que flanquearan la secuencias codificante de la

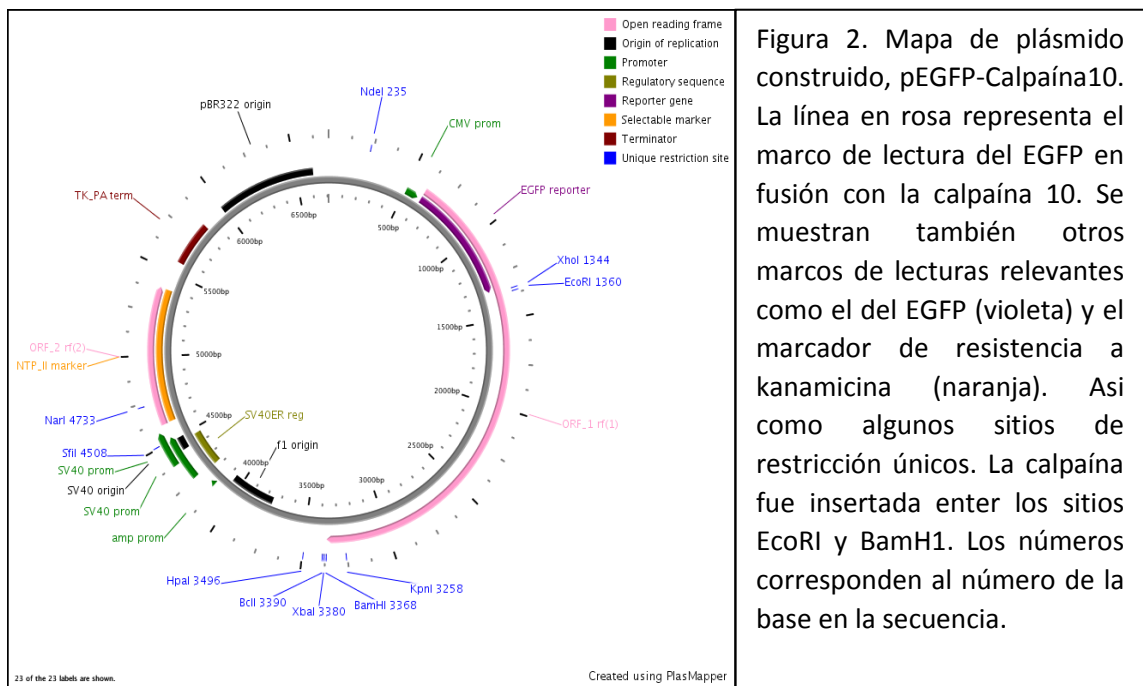
proteína, desde la primera metionina hasta el codón de terminación (Tabla 1). Se diseñaron oligonucleótidos específicos para la amplificación de la secuencia codificante de la calpaína 10 de *Mus musculus*, dado que se trabajó con un neuroblastoma de ratón. Sin embargo, ya que las secuencias de calpaína 10 de ratón y humano tienen una identidad del 86% y comparten los mismos sitios activos de la proteasa, pensamos que en el futuro se podría utilizar el vector construido aquí en neuroblastomas de origen humano. Los primers se analizaron en la plataforma virtual Primer Blast del NCBI para confirmar su especificidad y la temperatura de alineamiento. A partir de las secuencias obtenidas se diseñó el plan de clonación y se hizo un mapa del constructo pEGFP-calpaína 10 para verificar que la proteína quimérica siguiera un mismo marco de lectura dentro del plásmido pEGFP-C1 de manera que la calpaína 10 sea expresada como fusión del extremo C' terminal de la proteína EGFP sin codones de terminación (Fig. 2).

Calp	Primer	Secuencia (5'-3')	Enzima de restricción	Sitio de clonación en pEGFP	Gen ID NCBI	Amplicón (bp)	Tm	GC%
10	For	GCGAATTCGAT GCGGGCGGTCC GGGCCGAG	EcoRI	1359	NM_011796.2	2018	78.63	73.33
	Rev	GTGGATCCTCAG GCTTTCATCACT GCCAT	BamHI	1390	NM_011796.2	2018	68.37	51.72

Tabla 1. Diseño de primers.

## 4.2 Construcción y análisis del plásmido

Primero se amplificó la calpaína 10 a partir de ADNc de ratón (Fig. 3A), el cual tiene una longitud de 2000 bp. Posteriormente se digirieron tanto el plásmido pEGFP y la calpaína 10 con las enzimas correspondientes (Fig. 3B). La PCR y las digestiones se verificaron mediante elctroforesis en geles de agarosa. El plásmido linearizado genera una banda



de 4.7 Kbp, debido a la concentración de agarosa, la banda se observa cerca del marcador de 5 Kbp. Posteriormente, los dos fragmentos se purificaron y se ligaron, la calpaína 10 con el pEGFP. Al ligarse, el plásmido no linearizado produce múltiples bandas por arriba del peso del plásmido linearizado, lo que indica que la ligación fue efectiva (Fig. 3C).

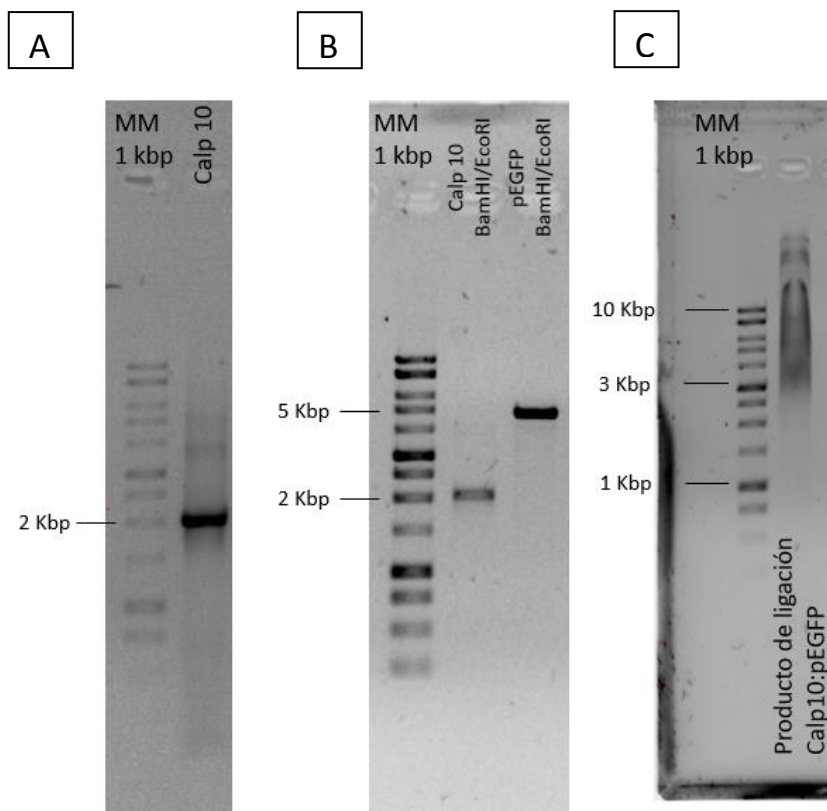


Figura 3. Amplificación por PCR de la calpaína 10 (A) y digestión doble de la calpaína 10 y el pEGFP (B) con BamHI y EcoRI que se corrieron después de la purificación por gel. (C) La ligación entre calpaína 10 y pEGFP se corrió en un gel de agarosa 0.8% y se evidenció al observarse varias bandas correspondientes al vector unido a más de una vez al inserto. Las bandas se observan de gran peso molecular dado que no se inactivó la enzima luego de la

El plásmido se introdujo en células *E. coli* de la cepa DH $\alpha$ 5. Solo aquellas células que adquirieron el plásmido son capaces de sobrevivir en un medio de cultivo suplementado con kanamincina. Para identificar aquellas colonias que fueron transfectadas con el constructo deseado, se realizó un análisis de restricción para el constructo con las enzimas de restricción Bgl II. Dicha enzima hace dos cortes dentro del constructo pEGFP-Calpaína10, lo que produce dos fragmentos 732 bp y 5986 bp. En la Fig. 4 se observa el análisis de 2 colonias. Una vez seleccionada una clona con el patrón de restricción esperado se enviaron a secuenciar utilizando dos primers que

flanquean el sitio de clonación múltiple del plásmido pEGFP (Ver materiales y métodos).

A partir del cromatograma de la secuenciación se analizaron y corrigieron visualmente las bases no definidas (Fig. 5). El análisis del plásmido tras la secuenciación consistió en verificar base por base con su respectiva señal en el cromatograma y la discriminación de señales de diferentes intensidades. Este análisis se realizó con cuidado pues a lo largo del cromatograma se va observando como las intensidades de las señales van disminuyendo, por lo que las señales se van confundiendo con el ruido de fondo. Debido a que la secuenciación tiene una resolución de 1000 bp aproximadamente, se utilizaron dos oligonucleótidos que flanquearon el sitio de clonación múltiple del plásmido para que secuenciaran ambas hebras. De esta manera, se obtuvieron alrededor de las primeras 1000 bp y alrededor de las últimas 1000 bp de la secuencia

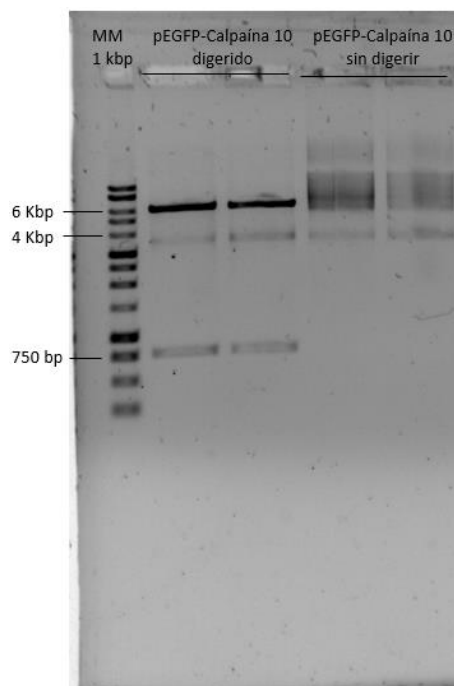


Figura 4. Análisis de restricción del constructo pEGFP-Calpaína 10 con la enzima de restricción BgIII. En este gel se muestra el análisis por digestión de 2 colonias. Los dos carriles de la izquierda muestran el patrón de restricción esperado para el constructo pEGFP-Calpaína 10: dos bandas de 732 bp y 5986 bp. Los dos carriles de la derecha muestran el plásmido de dichas colonias sin digerir.

integrada al plásmido.

Una vez resuelta la secuenciación en el cromatograma, se extrajo la secuencia en formato fasta y en la plataforma virtual de ORF finder del NCBI se encontraron los seis marcos de lectura de la secuencia para encontrar el marco de lectura correspondiente al plan de clonación (Fig. 6) y así, verificar que el marco no se encuentre modificado o

que no haya un codón de terminación en la secuencia que dé como resultado una proteína trunca no funcional. Adicionalmente, se verificó que la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la calpaína 10 insertada en el vector fuera la misma que la secuencia publicada de la calpaína 10 de ratón en el GeneBank del NCBI (Fig. 7). La secuenciación indicó que el constructo pEGFP-Calpaína10 es el que se esperaba.

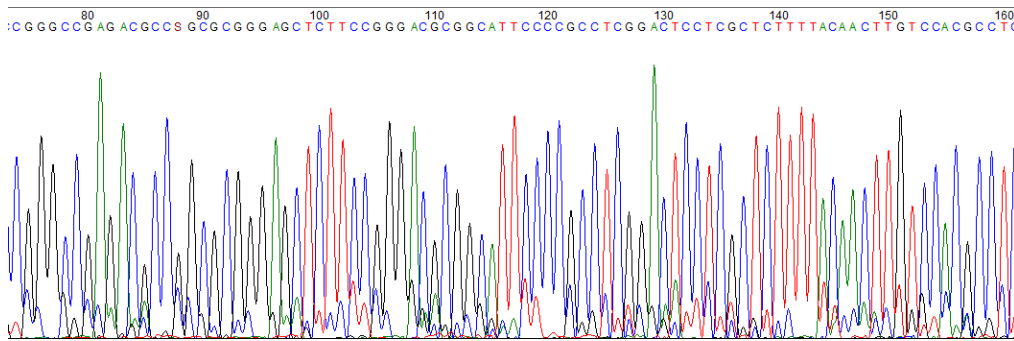


Figura 5. Fragmento del cromatograma del constructo Calp10pEGFP.

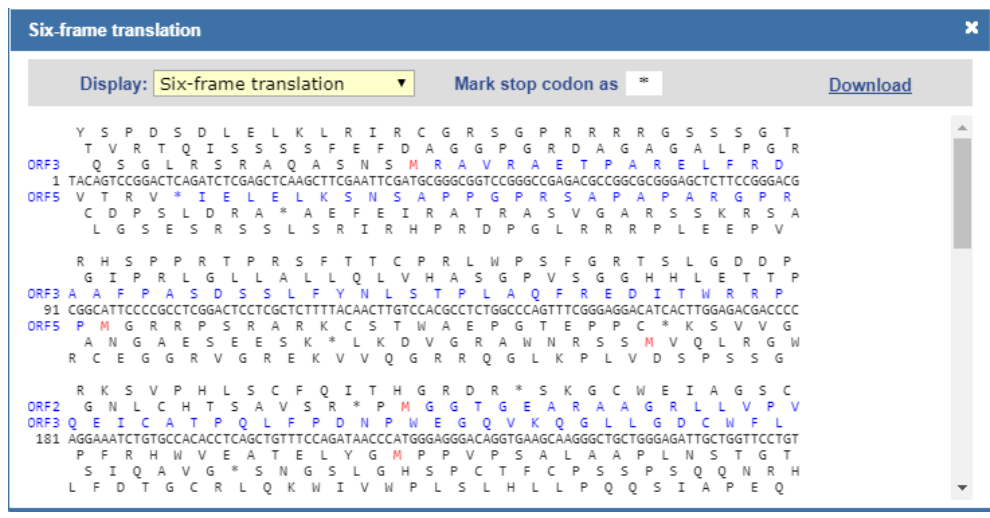


Figura 6. Visualización de los seis marcos de lectura de la secuencia de Calp10pEGFP

A

Mus musculus calpain 10, mRNA (cDNA clone MGC:11401 IMAGE:3154780), complete cds  
Sequence ID: [BC005681.1](#) Length: 2537 Number of Matches: 1

Range 1: 111 to 946 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1539 bits(833)	0.0	836/837(99%)	1/837(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGCGGGCGGTCCGGGCCGAGACGCCGGCGGGAGCTCTTCCGGGACGCGGCATTCCCC			60
Sbjct 111	ATGCGGGCGGTCCGGGCCGAGACGCCGGCGGGAGCTCTTCCGGGACGCGGCATTCCCC			170
Query 61	GCCTCGGACTCCTCGCTCTTTTACAACCTTGCCACGCCTCTGGCCAGTTTCGGGAGGAC			120
Sbjct 171	GCCTCGGACTCCTCGCTCTTTTACAACCTTGCCACGCCTCTGGCCAGTTTCGGGAGGAC			230
Query 121	ATCACTTGGAGACGACCCAGGAAATCTGTGCCACACCTCAGCTGTTTCCAGATAACCCA			180
Sbjct 231	ATCACTTGGAGACGACCCAGGAAATCTGTGCCACACCTCAGCTGTTTCCAGATAACCCA			290
Query 181	TGGGAGGGACAGGTGAAGCAAGGGCTGCTGGGAGATTGCTGGTTCCTGTGTGCCTGTGCC			240
Sbjct 291	TGGGAGGGACAGGTGAAGCAAGGGCTGCTGGGAGATTGCTGGTTCCTGTGTGCCTGTGCC			350
Query 241	GCCCTTCAGAAGAGTCAACACCTCCTGGACCAGGTCTTCCCTCCAGGACAGCCAGGCTGG			300
Sbjct 351	GCCCTTCAGAAGAGTCAACACCTCCTGGACCAGGTCTTCCCTCCAGGACAGCCAGGCTGG			410
Query 301	TCTGACCAGAAATACCAAGGCTTCTTCACTGTCCGATTGGCAGTTTGGACTGGGAG			360
Sbjct 411	TCTGACCAGAAATACCAAGGCTTCTTCACTGTCCGATTGGCAGTTTGGACTGGGAG			470

B

calpain-10 [Mus musculus]

Sequence ID: [NP\\_035926.2](#) Length: 666 Number of Matches: 5

[▶ See 4 more title\(s\)](#)

Range 1: 1 to 232 [GenPept](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
480 bits(1236)	2e-172	Compositional matrix adjust.	232/232(100%)	232/232(100%)	0/232(0%)
Query 1	MRAVRAETPARELFRDAAFPASDSSLFYNLSTPLAQFREDITWRRPQEICATPQLFPDNP				60
Sbjct 1	MRAVRAETPARELFRDAAFPASDSSLFYNLSTPLAQFREDITWRRPQEICATPQLFPDNP				60
Query 61	WEGQVKQGLLDGDCWFLCACAALQKSOHLLDQVFPFGQPGWSDQKYQGFFTCRIWQFGHWE				120
Sbjct 61	WEGQVKQGLLDGDCWFLCACAALQKSOHLLDQVFPFGQPGWSDQKYQGFFTCRIWQFGHWE				120
Query 121	EVTIDDRLPCLAGRLCFSRCQREDVFWLPLEKAYAKVHGSYEHLLWAGQVADALVDLTGS				180
Sbjct 121	EVTIDDRLPCLAGRLCFSRCQREDVFWLPLEKAYAKVHGSYEHLLWAGQVADALVDLTGS				180
Query 181	LAERWSLKDVTKASGQDRPSGGEHRTCRLHLKDRCLISCSVLSPRAGAR			232	
Sbjct 181	LAERWSLKDVTKASGQDRPSGGEHRTCRLHLKDRCLISCSVLSPRAGAR			232	

Figura 7. Alineamiento de la secuencia de la calpaína 10 del GeneBank del NCB de nucleótidos (A) y aminoácidos (B) con la calpaína 10 del constructo secuenciado utilizando la plataforma virtual Nucleotide Blast y Protein Blast del NCBI.



### 4.3 Estandarización de la transfección

La línea celular de neuroblastomas N1E-115 utilizada permite transfecciones heterólogas y es adecuada para el objetivo del trabajo porque expresa canales de sodio dependientes de voltaje de manera nativa para poder estudiar sus interacciones. Tras la caracterización de este sistema en células de neuroblastoma de ratón se buscará realizar estudios en otras líneas celulares como en células de neuroblastoma humano o en astrocitomas, en donde se observó aumento de los niveles de la calpaína 10 en muestras de cerebro con patología tipo Alzheimer [72].

Para probar la expresión del constructo, se cultivaron células de neuroblastoma de la línea N1E-115 a diferentes densidades, se sembraron por duplicado 60 000, 120 000 y 240 000 células. Al día siguiente se observaron las placas para evaluar la confluencia de los neuroblastomas que se encontró entre 50% y 80%, y se transformaron con los plásmidos de pEGFP como control y pEGFP-Calpaína 10. La densidad de sembrado que mostró un mayor porcentaje de transfección fue la de 60 000 en pozos de 35 mm (datos no mostrados).

Tabla 2. Porcentaje de células transfectadas con pEGFP y con pEGFP-Calp10 para las proporciones ADN:lipofectamina 1:2, 1:4 y 1:8. La proporción 1:8 para células transfectadas

pEGFP	Células totales	Células transfectadas	% transfección	Media	Varianza	Desviación estándar
Ratio 1:4	150	72	48	51.3	11.5	3.4
	178	100	56			
	754	374	50			
Ratio 1:2	119	50	42	36	18.6	4.3
	180	62	34			
	133	43	32			
Calp10pEGFP	Células totales	Células transfectadas	% transfección	Media	Varianza	Desviación estándar
Ratio 1:8	363	103	28	34	34.6	5.9
	245	80	32			
	206	87	42			
Ratio 1:4	168	94	55	50	16.6	4.1
	259	117	45			
	269	135	50			
Ratio 1:2	268	99	36	39	18	4.2
	332	151	45			
	246	89	36			

con pEGFP no se muestra.

A continuación, se evaluó el porcentaje de transfección utilizando los ratios de ADN:lipofectamina de 1:2, 1:4 y 1:8 usando 0.8 ug del constructo Calp10pEGFP por placa y por duplicado. Por conteo de células transfectadas se calculó el porcentaje de transfección en tres distintos campos utilizando el microscopio de fluorescencia. El ratio 1:4 mostró tener el mayor porcentaje llegando al 50% de transfección (Fig. 8) (Tabla 2).

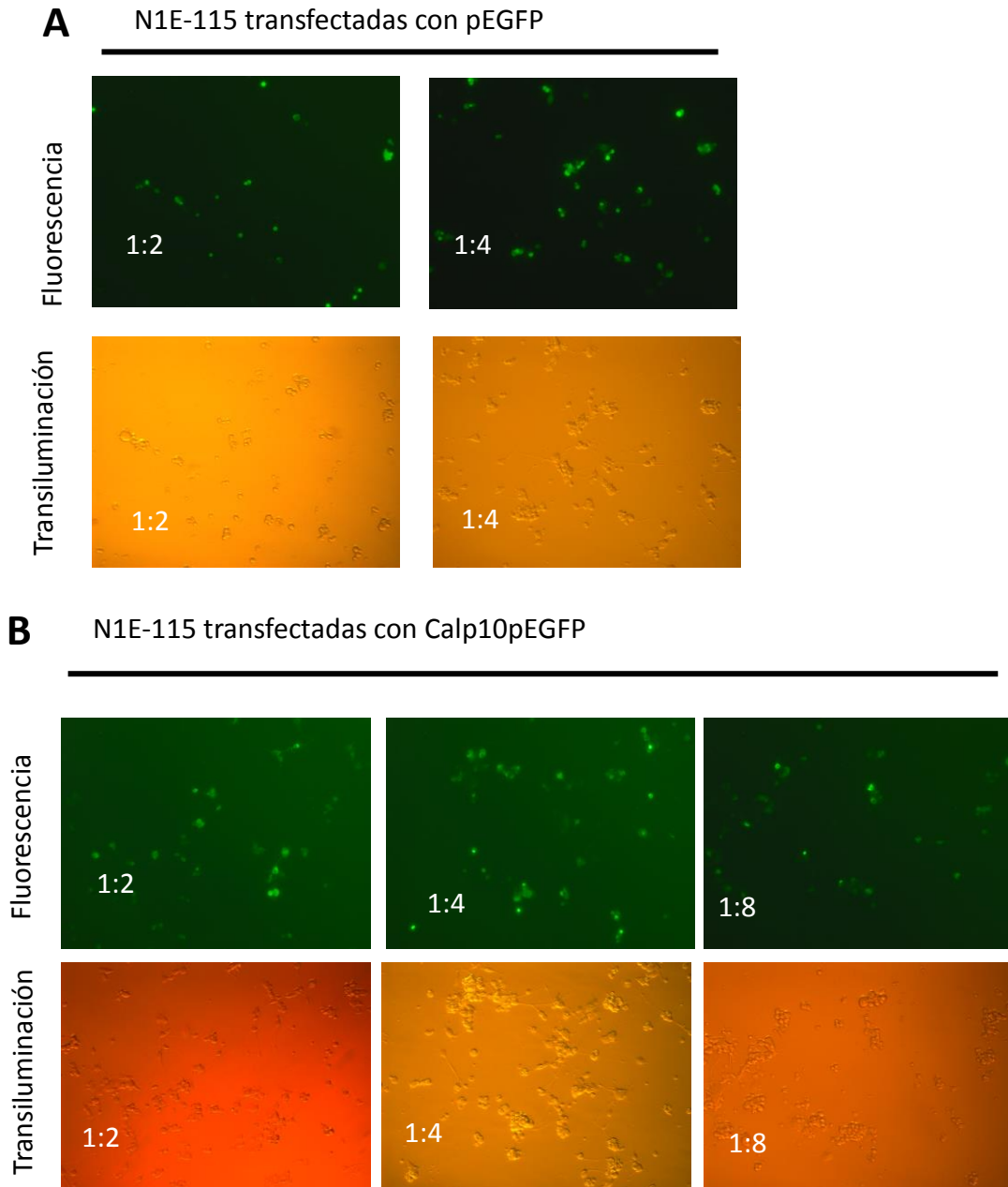


Figura 8. N1E-115 transfectadas con pEGFP (A) y con el constructo del plásmido pEGFP con calpaína 10, Calp10pEGFP (B). Las transfecciones se realizaron los ratios de ADN (ug): lipofectamina (ul), 1:2, 1:4 y 1:8. Para todas las transfecciones se utilizó 0.8ug de plásmido.

#### 4.4 Identificación de la Calpaína 10 exógena

Una vez definidas las condiciones de transfección, se hicieron nuevas transfecciones para determinar la expresión de la calpaína exógena. Las células fueron recolectadas y resuspendidas en RIPA buffer para la lisis celular. Las muestras de proteínas se cuantificaron mediante el ensayo de Bradford comparando contra una curva estándar de albúmina. En la figura 9 se graficó la absorbancia de las muestras estándares contra su concentración para obtener una ecuación lineal de la gráfica y así calcular la concentración de las muestras (Tabla 3) (Fig. 9).

Adicionalmente se evaluó la integridad de las proteínas de las muestras de las células N1E-115 transfectadas con pEGFP y transfectadas con pEGFP-Calpaína 10 en un gel de poliacrilamida al 8% teñido con azul de coomasie. Se observaron varias bandas definidas indicando la integridad de la muestra (Fig. 10).

Figura 9. Gráfica de concentración protéica de muestras estándares contra su absorbancia.

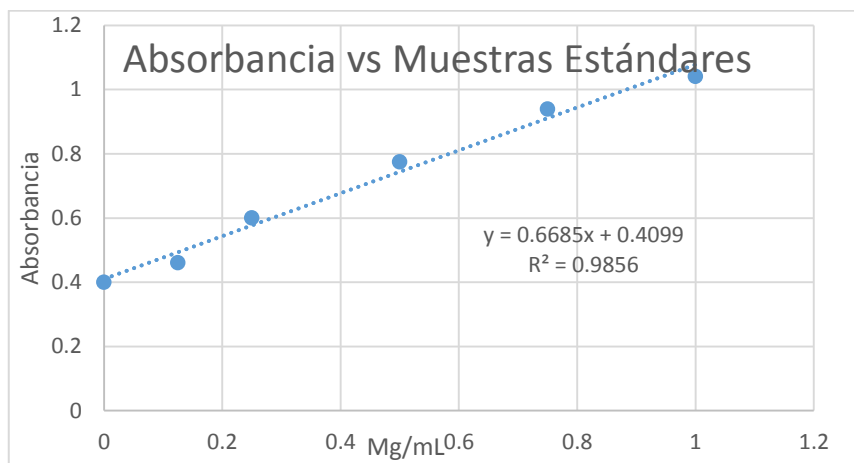


Tabla 3. Concentración de proteínas de las muestras de N1E-115 transfectadas con pEGFP y pEGFP-Calpaína 10.

N1E 115 transfección	Media de absorbancias	Muestras (mg/ml)
3 ug pEGFP:12 uL lipofectamina	0.907	7.4
3 ug Calp10pEGFP:12 uL lipofectamina	0.845	6.5

La expresión de la proteína EGFP permitió visualizar las células transfectadas, sin embargo, fue necesaria la inmunodetección de la calpaína 10 para confirmar la sobre expresión cualitativa de esta sobre los niveles basales de la proteína endógena. El ensayo de Western blot confirmó la sobre expresión de la proteína quimérica de calpaína 10 con EGFP (Fig. 11). La calpaína 10 tiene un peso molecular alrededor de los 75 kDa y en fusión con la proteína EGFP da un peso molecular alrededor de 100 kDa. Todas las predicciones de peso molecular se realizaron en la plataforma virtual [https://www.bioinformatics.org/sms/prot\\_mw.html](https://www.bioinformatics.org/sms/prot_mw.html).

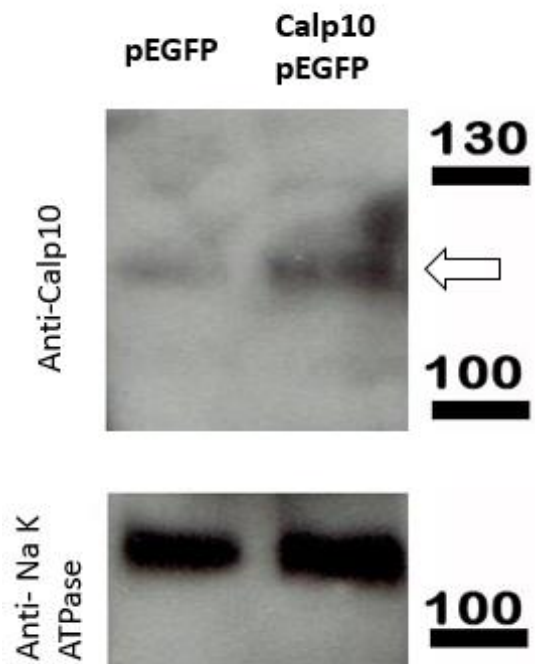
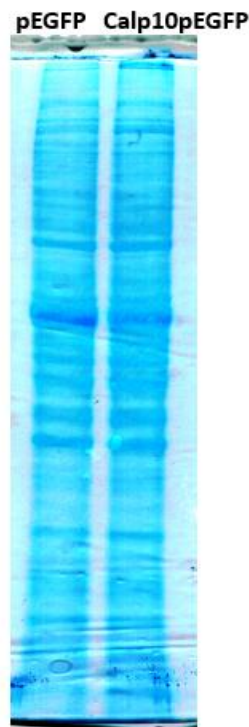


Figura 10. Integridad de proteínas. Gel de poliacrilamida 8% teñido con azul de coomasie. En el carril de pEGFP se corrieron las muestras de proteínas de células N1E-115 transfectadas solo con pEGFP, mientras que en el carril Calp10pEGFP se corrieron las muestras de proteínas de las células transfectadas con el constructo de pEGFP-Calpaína 10.

Figura 11. Inmunodetección de la calpaína 10. En el primer carril se cargaron las muestras proteicas de las células N1E-115 transfectadas con pEGFP y en el segundo carril se cargaron las muestras de las células transfectadas con el constructo pEGFP-Calpaína 10. La flecha indica la banda de la calpaína 10.

## V. Discusión

La interacción entre la calpaína 10 con isoformas de los  $\text{Na}_v$  generó varias preguntas sobre el rol de la calpaína 10 en mecanismos de regulación de los canales, si los proteoliza y si esta proteólisis está involucrada en mecanismos neurodegenerativos. Para caracterizar mejor la interacción entre la calpaína 10 y los  $\text{Na}_v$  se produjo una herramienta molecular que permite su estudio en células de neuroblastoma.

La construcción de un sistema de expresión heterólogo de calpaína 10 permitirá sobre expresar la calpaína 10 en neuroblastomas de la línea celular N1E-115, formando un modelo para el estudio de la sobre expresión observada en condiciones patológicas, que permitirá abordar estudios sobre su interacción con otras proteínas como con los  $\text{Na}_v$  y, además, el rol de la calpaína 10 en mecanismos de neurodegeneración.

El sistema de expresión para la calpaína 10 aquí construido utiliza el promotor temprano-inmediato del citomegalovirus humano (CMV). Para la expresión de genes heterólogos y la expresión transitoria de proteínas recombinantes en células de mamífero usualmente se utilizan vectores con promotores derivados de virus de mamíferos [84]. El CMV es utilizado para una fuerte expresión general y constitutiva en células de mamífero [85]. Este sistema de expresión ha demostrado obtener alta expresión de proteínas en diferentes líneas celulares comparado con otros promotores virales como promotores del virus del sarcoma mieloproliferativo (MPSV) y del virus del sarcoma Rous (RSV) [86, 87] y ha mostrado efectividad en la expresión transitoria y estable de transgenes en células madre embriónicas [88] y en neuronas, en donde obtuvo la mayor expresión de proteínas comparado con el promotor RSV [89, 90]. El promotor CMV ha sido utilizado con éxito previamente en otros estudios para la expresión transitoria de proteínas en células N1E-115. Kobayashi, M. y otros, transfectaron neuroblastomas de la línea N1E-115 con un vector de promotor CMV para la expresión transitoria de *neclina*, un supresor del crecimiento celular que promueve la diferenciación neuronal, y verificaron con éxito la sobre expresión de dicha proteína por inmunodetección. Asimismo, Gonzalez, E. y otros, lograron la expresión transitoria de isoformas de distrofina Dp71 fusionada con la proteína verde fluorescente GFP en un vector con promotor CMV en células HeLa, C2C12 y N1E-115.

La sobreexpresión de las proteínas fusión de isoformas Dp71 con GFP fue verificada y comparada con la expresión de la proteína endógena por inmunodetección [91-95]. Por las referencias mencionadas, se esperó que el vector para la calpaína 10 aquí construido tenga una fuerte expresión constitutiva en células N1E-115 durante la realización de los experimentos.

En estudios previos se han construido sistemas de expresión para la calpaína 10 utilizando el promotor CMV en células de fibroblastos y en células de hígado humano para la expresión transitoria [95, 77]. Dong, B y Liu, R. produjeron una calpaína 10 fusionada en su extremo C-terminal a la proteína verde fluorescente GFP para evaluar su rol en la disfunción mitocondrial *in vitro* y para evaluar la localización de la calpaína 10 en la mitocondria. La actividad proteasa de la calpaína 10 fue caracterizada *in vitro* en fracciones de mitocondria y se vio en aumento conforme el incremento de la concentración del calcio, sugiriendo que su actividad proteasa depende de él. Asimismo, la unión a la proteína GFP parece que no interfirió en su actividad proteolítica. Por otro lado, Arrington *et al.* sobre expresaron la calpaína 10 con un his-tag en su extremo C-terminal para su purificación y estudio de actividad *in vitro*. En este estudio concluyeron que la actividad proteolítica tanto de la calpaína 10 endógena y recombinante no pudo ser confirmada bajo condiciones *in vitro* y discuten que la falta de actividad de la calpaína 10 en sus resultados puede depender de las condiciones del estudio [77].

El constructo de este trabajo expresa la calpaína 10 fusionada con la proteína EGFP en su extremo N-terminal. Luego de caracterizar la expresión de la calpaína 10 en neuroblastomas, se evaluará su actividad proteolítica utilizando blancos conocidos y utilizando diferentes concentraciones de calcio para confirmar si su funcionalidad es dependiente de este y verificar que la proteína EGFP no interfiera en su actividad. En las calpaínas más estudiadas, la 1 y la 2, se ha visto que cortan su extremo N-terminal como mecanismo de activación, dado que esto da un mayor aumento de sensibilidad al  $Ca^{+2}$  [14].

Se utilizó un anticuerpo policlonal para calpaína 10 producido contra un mapeo de péptidos cerca al extremo C-terminal. En la figura 11, la banda detectada tiene un peso

aparente mayor a 100 kDa, cuando la calpaína 10 tiene un peso de 75 kDa. Nuestros resultados indican que la calpaína 10 puede presentar modificaciones post-traduccionales, que cambian el peso molecular aparente de la proteína. Sin embargo, sería necesario realizar una secuenciación de la calpaína 10 para confirmar su presencia y una evaluación de la actividad de la proteína quimérica utilizando un blanco conocido para ver si la proteína EGFP fusionada afecta su rendimiento.

Otro hallazgo inesperado, es que la proteína de fusión es proteolizada, tal vez porque la calpaína 10 autoproteoliza su extremo N-terminal, pues aparece a la misma altura de la calpaína 10 endógena. De no cortar su extremo N-terminal, el peso aparente de la proteína sería todavía mayor que el de la proteína endógena. Sin embargo, pensamos que el constructo sí expresa la calpaína 10, ya que la señal de calpaína aumenta aproximadamente 3 veces con respecto a la proteína endógena. Como control, la membrana fue incubada también con un anticuerpo anti- $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPasa, cuya banda tiene un peso ligeramente superior a 100 kDa. La intensidad de dicha banda no fue diferente entre las dos muestras, lo que indica que las diferencias que observamos en la expresión de la calpaínas 10 son debidas a la expresión del constructo. Idealmente, un tercer blot con un anticuerpo anti-GFP podría orientarnos sobre si la quimera calpaína fue efectivamente proteolizada.

En la transfección de las células N1E-115, se utilizó la expresión de la proteína EGFP para identificar las células transfectadas y así poder calcular el porcentaje de transfección. La eficiencia de transformación se puede ver afectada por la pureza del ADN, el reactivo de transfección, la densidad celular y la confluencia, así como las mismas células utilizadas [96]. En un comienzo se utilizó el reactivo FuGene HD Transfection Reagent, pero se discontinuó porque se observó un porcentaje de transfección menor al 50% para las células transfectadas con pEGFP y casi nada de transfección para las células transfectadas con el constructo pEGFP-Calpaína 10. Hipotetizamos que las células transfectadas con pEGFP-Calpaína 10, tenían una tasa de muerte mayor que las células transfectadas con pEGFP, probablemente por activación de mecanismos de muerte celular por la calpaína 10 sobre expresada. Por lo que en los siguientes experimentos evaluamos las células transfectadas con azul de bromofenol

para evaluar la tasa de muerte, y en el microscopio de fluorescencia en menor tiempo después de la transfección para encontrar un cálculo de transfección más representativo. De igual manera, el porcentaje de transfección con FuGene HD Transfection Reagent fue de casi cero para las células con pEGFP-Calpaína 10, por lo que se procedió a cambiar el reactivo por lipofectamina y se logró alcanzar un porcentaje de transfección alrededor del 50% para todas las muestras, al evaluar distintas densidades celulares y ratios lipofectamina:ADN.

La densidad celular de sembrado óptima varía entre líneas celulares y reactivos de transfección. Una vez sembradas las células se espera un día de recuperación antes de la transfección y se evalúa la confluencia celular. Generalmente, se espera obtener una confluencia entre 50%-80% para obtener un buen porcentaje de transformación. Utilizar células con una confluencia menor puede resultar en poco crecimiento sin contacto célula-célula, lo que disminuye la eficiencia de transformación, mientras que el uso de células con alta densidad puede causar inhibición por contacto [97]. Utilizar células activas en constante división es ventajoso porque son más propensas a aceptar ADN foráneo que células quiescentes. En la estandarización de la densidad de sembrado se encontró que 60 000 células en pozos de 35 mm dio una mayor eficiencia de transformación y se extrapoló a pozos de 100 mm para las siguientes transformaciones.

Respecto al ratio ADN:lipofectamina, la eficiencia de transformación más alta fue de 50% con un ratio de 1:4. Para determinar las condiciones óptimas de la transfección y de expresión proteica también se puede estandarizar la cantidad de ADN y la cantidad de lipofectamina agregada [98].

### **Perspectivas futuras**

Al igual que las demás calpains atípicas, en la calpaína 10 se sustituye el dominio IV de motivo mano penta EF de unión al calcio por otro llamado dominio T, por lo que no tiene tantos sitios unión al calcio como las calpains típicas, sin embargo, se ha visto que su actividad proteolítica incrementa en correlación con el aumento de la concentración de calcio intracelular y disminuye con el uso de quelantes de calcio [77].



Interesantemente, también se reportado que la calpaina 10 puede activarse aun en ausencia del calcio, por lo cual se ha propuesto que su actividad puede ser regulada mediante otros mecanismos [15, 77], por lo que no descartamos que la calpaina 10 pudiera autoproteolizar el extremo amino de su secuencia liberandose del EGFP. Aun así, para estudios posteriores de los posibles blancos de la calpaína 10, correspondería trabajar con neuroblastomas tratados bajo diferentes concentraciones de calcio para evaluar la actividad proteolítica de la calpaína 10, si responde a la concentración intracelular de calcio y evaluar sus interacciones con otras proteínas. Asimismo, de encontrarse un posible blanco proteolizado por la calpaína 10, como los  $Na_v$ , se trabajaría con bloqueantes de otras cistein proteasas para verificar que la proteólisis se debe a la acción misma de la calpaína.

La calpaína 10 se ha visto presente en citosol, mitocondria y en núcleo [77, 100]. Arrington *et al.*, 2006 descubrieron que tiene un péptido señal con ubicación en la mitocondria y vieron que tiene mayor actividad en la matriz mitocondrial [77]. Estudios posteriores vieron que la calpaína 10 actúa degradando proteínas de la cadena respiratoria de transporte de electrones, localizándola en la mitocondria [99]. Sin embargo, utilizando métodos de inmunohitoquímica, también se ha visto a la calpaína 10 localizada tanto en citosol como en núcleo, más aun, se ha encontrado a la calpaína 10 proteolizada localizada en el núcleo, por lo que se discute si su movilización dentro de la célula depende de las concentraciones de calcio, de su estado activo o inactivo o de diferentes versiones proteolizadas o autoproteolizadas de la misma [100]. De la misma manera, dado que las isoformas de la calpaína 10 se asocian a la membrana con diferente afinidad es posible suponer que las diferentes isoformas de calpaína 10 tienen su propio estado de activación característico dependiente de su asociación a la membrana y su afinidad al calcio, ya que se ha sugerido que la unión de las calpaínas a la membrana plasmática permite su activación de una manera calcio dependiente por auto proteólisis de su extremo N-terminal [14, 3].

La reconfirmación de que la calpaína 10 del constructo corta su extremo N-terminal indicará si es posible responder las preguntas sobre su localización. Si la calpaína 10 corta el EGFP unido a su extremo N-terminal, entonces no servirá para localizarla

dentro de la célula. Sin embargo, se espera que el constructo de este trabajo ayude a estudiar la interacción con los  $\text{Na}_v$  y, más aún, si puede proteolizarlos y si participa en mecanismos de regulación de los canales.

## VI. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Siklos M, BenAissa M, Thatcher GR. Cysteine proteases as therapeutic targets: does selectivity matter? A systematic review of calpain and cathepsin inhibitors. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2015 Nov 1;5(6):506-19.
- [2] Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei WE, Cong J. The calpain system. *Physiological reviews*. 2003 Jul; 83(3):731-801.
- [3] Sorimachi H, Hata S, Ono Y. Calpain-1/ $\mu$ -calpain. In *Handbook of Proteolytic Enzymes* 2013 Jan 1 (pp. 1995-2007). Academic Press.
- [4] Ono Y, Sorimachi H. Calpains—an elaborate proteolytic system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 2012 Jan 1; 1824(1):224-36..
- [5] Saavedra A, Ballesteros JJ, Tyebji S, Martínez-Torres S, Blázquez G, López-Hidalgo R, Azkona G, Alberch J, Martín ED, Pérez-Navarro E. Proteolytic Degradation of Hippocampal STEP 61 in LTP and Learning. *Molecular neurobiology*. 2019 Feb 1;56(2):1475-87.
- [6] Dutt P, Croall DE, Arthur JS, De Veyra T, Williams K, Elce JS, Greer PA. m-Calpain is required for preimplantation embryonic development in mice. *BMC developmental biology*. 2006 Dec;6(1):3..
- [7] Sharma AK, Rohrer B. Calcium-induced calpain mediates apoptosis via caspase-3 in a mouse photoreceptor cell line. *Journal of Biological Chemistry*. 2004 Aug 20;279(34):35564-72.
- [8] Yang X, Sun J, Xia D, Can X, Liu L, Zhang J, Xu H, Du N, Liu W, Shen F, Zhang Z. Capn4 enhances osteopontin expression through activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway to promote epithelial ovarian carcinoma metastasis. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2017;42(1):185-97.

- [9] McGinn MJ, Kelley BJ, Akinyi L, Oli MW, Liu MC, Hayes RL, Wang KK, Povlishock JT. Biochemical, structural, and biomarker evidence for calpain-mediated cytoskeletal change after diffuse brain injury uncomplicated by contusion. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 2009 Mar 1;68(3):241-9.
- [10] Zatz M, Starling A. Calpains and disease. *New England Journal of Medicine*. 2005 Jun 9;352(23):2413-23.
- [11] Vosler PS, Brennan CS, Chen J. Calpain-mediated signaling mechanisms in neuronal injury and neurodegeneration. *Molecular neurobiology*. 2008 Aug 1;38(1):78-100.
- [12] Mahaman YA, Huang F, Kessete Afewerky H, Maibouge TM, Ghose B, Wang X. Involvement of calpain in the neuropathogenesis of Alzheimer's disease. *Medicinal research reviews*. 2019 Mar;39(2):608-30.
- [13] Baki A, Tompa P, Alexa A, Molnár O, Friedrich P. Autolysis parallels activation of mu-calpain. 1996 *Biochemical Journal* 318(Pt 3):897–901.
- [14] Piatkov KI, Oh JH, Liu Y, Varshavsky A. Calpain-generated natural protein fragments as short-lived substrates of the N-end rule pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014 Mar 4;111(9):E817-26.
- [15] Dong B, Liu R. Characterization of endogenous and recombinant human calpain-10. *Biochimie*. 2008 Sep 1;90(9):1362-71.
- [16] Campbell RL, Davies PL. Structure–function relationships in calpains. *Biochemical Journal*. 2012 Nov 1;447(3):335-51.
- [17] Ono Y, Saido TC, Sorimachi H. Calpain research for drug discovery: challenges and potential. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2016 Dec;15(12):854.
- [18] Tompa P, Buzder-Lantos P, Tantos A, Farkas A, Szilágyi A, Bánóczy Z, Hudecz F, Friedrich P. On the sequential determinants of calpain cleavage. *Journal of Biological Chemistry*. 2004 May 14;279(20):20775-85.

- [19] del Carmen Lafita-Navarro M, Conacci-Sorrell M. Identification of Calpain-Activated Protein Functions. In *Calpain 2019* (pp. 149-160). Springer, New York, NY.
- [20] Croall DE, Ersfeld K. The calpains: modular designs and functional diversity. *Genome biology*. 2007 Jun;8(6):218.
- [21] Griggs RB, Yermakov LM, Susuki K. Formation and disruption of functional domains in myelinated CNS axons. *Neuroscience research*. 2017 Mar 1;116:77-87.
- [22] Baudry M, Bi X. Calpain-1 and calpain-2: the yin and yang of synaptic plasticity and neurodegeneration. *Trends in neurosciences*. 2016 Apr 1;39(4):235-45.
- [23] Wang Y, Briz V, Chishti A, Bi X, Baudry M. Distinct roles for  $\mu$ -calpain and m-calpain in synaptic NMDAR-mediated neuroprotection and extrasynaptic NMDAR-mediated neurodegeneration. *Journal of Neuroscience*. 2013 Nov 27;33(48):18880-92.
- [24] Aversa M, Pellegrini M, Cervetto C, Pedrazzi M, Bavestrello M, De Tullio R, Salamino F, Pontremoli S, Melloni E. Physiological roles of calpain 1 associated to multiprotein NMDA receptor complex. *PloS one*. 2015 Oct 2;10(10):e0139750.
- [25] Doré K, Labrecque S, Tardif C, De Koninck P. FRET-FLIM investigation of PSD95-NMDA receptor interaction in dendritic spines; control by calpain, CaMKII and Src family kinase. *PLoS One*. 2014 Nov 13;9(11):e112170.
- [26] Baudry M, Chou MM, Bi X. Targeting calpain in synaptic plasticity. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2013 Jun 1;17(5):579-92.
- [27] Andres AL, Regev L, Phi L, Seese RR, Chen Y, Gall CM, Baram TZ. NMDA receptor activation and calpain contribute to disruption of dendritic spines by the stress neuropeptide CRH. *Journal of Neuroscience*. 2013 Oct 23;33(43):16945-60.
- [28] Bevers MB, Neumar RW. Mechanistic role of calpains in postischemic neurodegeneration. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2008 Apr;28(4):655-73.
- [29] Kurbatskaya K, Phillips EC, Croft CL, Dentoni G, Hughes MM, Wade MA, Al-Sarraj S, Troakes C, O'Neill MJ, Perez-Nievas BG, Hanger DP. Upregulation of calpain activity

precedes tau phosphorylation and loss of synaptic proteins in Alzheimer's disease brain. *Acta neuropathologica communications*. 2016 Dec;4(1):34.

[30] Yamashita T. Reconsider Alzheimer's disease by the 'calpain–cathepsin hypothesis'—a perspective review. *Progress in Neurobiology*. 2013 Jun 1;105:1-23.

[31] Camins, A., Verdaguer, E., Folch, J., & Pallàs, M. Involvement of calpain activation in neurodegenerative processes. *CNS drug reviews*. 2006 12(2), 135-148.

[32] Wu HY, Tomizawa K, Matsui H. Calpain-calcineurin signaling in the pathogenesis of calcium-dependent disorder. *Acta medica Okayama*. 2007 Jun 1;61(3):123.

[33] Singh R, Brewer MK, Mashburn CB, Lou D, Bondada V, Graham B, Geddes JW. Calpain 5 is highly expressed in the CNS, carries dual nuclear localization signals, and is associated with nuclear promyelocytic leukemia protein bodies. *Journal of Biological Chemistry*. 2014 May 16;jbc-M114..

[34] Catterall WA. Signaling complexes of voltage-gated sodium and calcium channels. *Neuroscience letters*. 2010 Dec 10;486(2):107-16.

[35] Eijkelkamp N, Linley JE, Baker MD, Minett MS, Cregg R, Werdehausen R, Rugiero F, Wood JN. Neurological perspectives on voltage-gated sodium channels. *Brain*. 2012 Aug 29;135(9):2585-612.

[36] de Lera Ruiz M, Kraus RL. Voltage-gated sodium channels: structure, function, pharmacology, and clinical indications. *Journal of medicinal chemistry*. 2015 May 14;58(18):7093-118.

[37] Hull JM, Isom LL. Voltage-gated sodium channel  $\beta$  subunits: the power outside the pore in brain development and disease. *Neuropharmacology*. 2018 Apr 1;132:43-57

[38] Iwata A, Stys PK, Wolf JA, Chen XH, Taylor AG, Meaney DF, Smith DH. Traumatic axonal injury induces proteolytic cleavage of the voltage-gated sodium channels modulated by tetrodotoxin and protease inhibitors. *Journal of neuroscience*. 2004 May 12;24(19):4605-13.

- [39] Schoch KM, von Reyn CR, Bian J, Telling GC, Meaney DF, Saatman KE. Brain injury-induced proteolysis is reduced in a novel calpastatin-overexpressing transgenic mouse. *Journal of neurochemistry*. 2013 Jun;125(6):909-20.
- [40] von Reyn CR, Spaethling JM, Mesfin MN, Ma M, Neumar RW, Smith DH, Siman R, Meaney DF. Calpain mediates proteolysis of the voltage-gated sodium channel  $\alpha$ -subunit. *Journal of Neuroscience*. 2009 Aug 19;29(33):10350-6.
- [41] Brocard C, Plantier V, Boulenguez P, Liabeuf S, Bouhadfane M, Viallat-Lieutaud A, Vinay L, Brocard F. Cleavage of Na<sup>+</sup> channels by calpain increases persistent Na<sup>+</sup> current and promotes spasticity after spinal cord injury. *Nature medicine*. 2016 Apr;22(4):404.
- [42] Wang J, Ou SW, Wang YJ. Distribution and function of voltage-gated sodium channels in the nervous system. *Channels*. 2017 Nov 2;11(6):534-54.
- [43] Arnold R, Huynh W, Kiernan MC, Krishnan AV. Ion channel modulation as a therapeutic approach in multiple sclerosis. *Current medicinal chemistry*. 2015 Dec 1;22(38):4366-78.
- [44] Kaplan DI, Isom LL, Petrou S. Role of sodium channels in epilepsy. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2016 Jun 1;6(6):a022814.
- [45] Wada A, Yanagita T, Yokoo H, Kobayashi H. Regulation of cell surface expression of voltage-dependent Nav1.7 sodium channels: mRNA stability and posttranscriptional control in adrenal chromaffin cells. *Front Biosci*. 2004 May 1;9:1954-66.
- [46] Onwuli DO, Yañez-Bisbe L, Pinsach-Abuin ML, Tarradas A, Brugada R, Greenman J, Pagans S, Beltran-Alvarez P. Do sodium channel proteolytic fragments regulate sodium channel expression?. *Channels*. 2017 Sep 3;11(5):476-81.
- [47] Arratia-Cortés, LM. Vilches-Flores A, Vega AV. Up-regulation of calpain 10a in response to glucose and its possible interaction with sodium channels. Washington DC. November 15-19. Society for Neuroscience, 2014. Abstract 16878.
- [48] Horikawa Y, Oda N, Cox NJ, Li X, Orho-Melandar M, Hara M, Hinokio Y, Lindner TH, Mashima H, Schwarz PE, del Bosque-Plata L. Genetic variation in the gene encoding

calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nature genetics*. 2000 Oct;26(2):163.

[49] Ma H, Fukiage C, Kim YH, Duncan MK, Reed NA, Shih M, Azuma M, Shearer TR. Characterization and expression of calpain 10 a novel ubiquitous calpain with nuclear localization. *Journal of Biological Chemistry*. 2001 Jul 27;276(30):28525-31.

[50] Cui J, Xu X, Yin S, Chen F, Li P, Song C. Meta-analysis of the association between four CAPN10 gene variants and gestational diabetes mellitus. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2016 Sep 1;294(3):447-53.

[51] Arslan E, Acik L, Gunaltili G, Ayvaz G, Altinova AE, Arslan M. The effect of calpain-10 gene polymorphism on the development of type 2 diabetes mellitus in a Turkish population. *Endokrynologia Polska*. 2014;65(2):90-5.

[52] Picos-Cárdenas VJ, Sáinz-González E, Miliar-Garcia A, Romero-Zazueta A, Quintero-Osuna R, Leal-Ugarte E, Peralta-Leal V, Meza-Espinoza JP. Calpain-10 gene polymorphisms and risk of type 2 diabetes mellitus in Mexican mestizos. *Genet Mol Res*. 2015 Mar 27;14(1):2205-15.

[53] Maleki F, Haghani KA, Shokouhi SH, Mahmoodi KH, Sayehmiri KO, Mahdieh N, Bakhtiyari SA. A case-control study on the association of common variants of CAPN10 gene and the risk of type 2 diabetes in an Iranian population. *Clin Lab*. 2014 Apr;60(4):663-70.

[54] Li YY, Gong G, Geng HY, Yang ZJ, Zhou CW, Xu J, Qian Y, Wang XM, Chen AL. CAPN10 SNP43 G> A gene polymorphism and type 2 diabetes mellitus in the Asian population: a meta-analysis of 9353 participants. *Endocrine journal*. 2014:EJ14-0297.

[55] Bodhini D, Radha V, Ghosh S, Sanapala KR, Majumder PP, Rao MR, Mohan V. Association of calpain 10 gene polymorphisms with type 2 diabetes mellitus in Southern Indians. *Metabolism*. 2011 May 1;60(5):681-8.

[56] Zaharna MM, Abed AA, Sharif FA. Calpain-10 gene polymorphism in type 2 diabetes mellitus patients in the Gaza Strip. *Medical Principles and Practice*. 2010;19(6):457-62.

- [57] Eto M, Okayama M, Takeshima T, Kumada M, Aonuma T, Nakamura Y, Kajii E. EFFECT OF GENE POLYMORPHISM OF CALPAIN-10 ON THE RISK OF HYPERTENSION IN JAPANESE POPULATION. *Journal of the American College of Cardiology*. 2017 Mar 21;69(11 Supplement):1842.
- [58] Orho-Melander M, Klannemark M, Svensson MK, Ridderstråle M, Lindgren CM, Groop L. Variants in the calpain-10 gene predispose to insulin resistance and elevated free fatty acid levels. *Diabetes*. 2002 Aug 1;51(8):2658-64.
- [59] Buraczynska M, Wacinski P, Stec A, Kuczmaszewska A. Calpain-10 gene polymorphisms in type 2 diabetes and its micro-and macrovascular complications. *Journal of Diabetes and its Complications*. 2013 Jan 1;27(1):54-8.
- [60] Russell JW, Zilliox LA. Diabetic neuropathies. *Continuum: Lifelong Learning in Neurology*. 2014 Oct;20(5 Peripheral Nervous System Disorders):1226.
- [61] Aslam A, Singh J, Rajbhandari S. Pathogenesis of painful diabetic neuropathy. *Pain research and treatment*. 2014;2014
- [62] Todorovic SM. Painful diabetic neuropathy: prevention or suppression?. In *International review of neurobiology* 2016 Jan 1 (Vol. 127, pp. 211-225). Academic Press.
- [63] Colloca L, Ludman T, Bouhassira D, Baron R, Dickenson AH, Yarnitsky D, Freeman R, Truini A, Attal N, Finnerup NB, Eccleston C. Neuropathic pain. *Nature reviews Disease primers*. 2017 Feb 16;3:17002.
- [64] Yang L, Li Q, Liu X, Liu S. Roles of voltage-gated tetrodotoxin-sensitive sodium channels NaV1. 3 and NaV1. 7 in diabetes and painful diabetic neuropathy. *International journal of molecular sciences*. 2016 Sep 5;17(9):1479.
- [65] Blesneac I, Themistocleous AC, Fratter C, Conrad LJ, Ramirez JD, Cox JJ, Tesfaye S, Shillo PR, Rice AS, Tucker SJ, Bennett DL. Rare NaV1. 7 variants associated with painful diabetic peripheral neuropathy. *Pain*. 2018 Mar;159(3):469.



- [66] Ma M, Ferguson TA, Schoch KM, Li J, Qian Y, Shofer FS, Saatman KE, Neumar RW. Calpains mediate axonal cytoskeleton disintegration during Wallerian degeneration. *Neurobiology of disease*. 2013 Aug 1;56:34-46.
- [66] Kharatmal SB, Singh JN, Sharma SS. Calpain inhibitor, MDL 28170 confer electrophysiological, nociceptive and biochemical improvement in diabetic neuropathy. *Neuropharmacology*. 2015 Oct 1;97:113-21.
- [67] Shinohara M, Sato N. Bidirectional interactions between diabetes and Alzheimer's disease. *Neurochemistry international*. 2017 Sep 1;108:296-302.
- [68] Guerrero-Berroa E, Schmeidler J, Beeri MS. Neuropathology of type 2 diabetes: a short review on insulin-related mechanisms. *European Neuropsychopharmacology*. 2014 Dec 1;24(12):1961-6.
- [69] Takeda S, Sato N, Uchio-Yamada K, Sawada K, Kunieda T, Takeuchi D, Kurinami H, Shinohara M, Rakugi H, Morishita R. Diabetes-accelerated memory dysfunction via cerebrovascular inflammation and A $\beta$  deposition in an Alzheimer mouse model with diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010 Apr 13;107(15):7036-41.
- [70] Domínguez RO, Pagano MA, Marschoff ER, González SE, Repetto MG, Serra JA. Alzheimer disease and cognitive impairment associated with diabetes mellitus type 2: associations and a hypothesis. *Neurología (English Edition)*. 2014 Nov 1;29(9):567-72.
- [71] Liu Y, Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX. Deficient brain insulin signalling pathway in Alzheimer's disease and diabetes. *The Journal of pathology*. 2011 Sep;225(1):54-62.
- [72] Garwood C, Faizullahoy A, Wharton SB, Ince PG, Heath PR, Shaw PJ, Baxter L, Gelsthorpe C, Forster G, Matthews FE, Brayne C. Calcium dysregulation in relation to Alzheimer-type pathology in the ageing brain. *Neuropathology and applied neurobiology*. 2013 Dec;39(7):788-99.

- [73] Arratia Cortés LM. "Regulación de la expresión de mRNAs de calpaína 10 en células de neuroblastoma en respuesta a la elevación de glucosa". 2014. Tesis UNAM. <http://132.248.9.195/ptd2014/octubre/0721447/Index.html>.
- [74] Johnson JD, Han Z, Otani K, Ye H, Zhang Y, Wu H, Horikawa Y, Misler S, Bell GI, Polonsky KS. RyR2 and calpain-10 delineate a novel apoptosis pathway in pancreatic islets. *Journal of Biological Chemistry*. 2004 Jun 4;279(23):24794-802.
- [75] Covington MD, Schnellmann RG. Chronic high glucose downregulates mitochondrial calpain 10 and contributes to renal cell death and diabetes-induced renal injury. *Kidney international*. 2012 Feb 2;81(4):391-400.
- [76] Azuma M, Sakamoto-Mizutani K, Nakajima T, Kanaami-Daibo S, Tamada Y, Shearer TR. Involvement of calpain isoforms in retinal degeneration in WBN/Kob rats. *Comparative medicine*. 2004 Oct 15;54(5):533-42.
- [77] Arrington DD, Van Vleet TR, Schnellmann RG. Calpain 10: a mitochondrial calpain and its role in calcium-induced mitochondrial dysfunction. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2006 Dec;291(6):C1159-71.
- [78] Smith MA, Covington MD, Schnellmann RG. Loss of calpain 10 causes mitochondrial dysfunction during chronic hyperglycemia. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2012 Jul 15;523(2):161-8.
- [79] Ling C, Groop L, Del Guerra S, Lupi R. Calpain-10 expression is elevated in pancreatic islets from patients with type 2 diabetes. *PLoS One*. 2009 Aug 18;4(8):e6558.
- [80] Weber JJ, Pereira Sena P, Singer E, Nguyen HP. Killing Two Angry Birds with One Stone: Autophagy Activation by Inhibiting Calpains in Neurodegenerative Diseases and Beyond. *BioMed research international*. 2019;2019
- [81] Potz BA, Abid MR, Sellke FW. Role of calpain in pathogenesis of human disease processes. *Journal of nature and science*. 2016;2(9).
- [82] Wang KK. Calpain and caspase: can you tell the difference?. *Trends in neurosciences*. 2000 Jan 1;23(1):20-6.

- [83] Guyton MK, Wingrave JM, Yallapragada AV, Wilford GG, Sribnick EA, Matzelle DD, Tyor WR, Ray SK, Banik NL. Upregulation of calpain correlates with increased neurodegeneration in acute experimental auto-immune encephalomyelitis. *Journal of neuroscience research*. 2005 Jul 1;81(1):53-61.
- [84] Khan KH. Gene expression in mammalian cells and its applications. *Advanced pharmaceutical bulletin*. 2013 Dec;3(2):257.
- [85] Kendall Morgan. Plasmids 101: The Promoter Region – Let's Go! for Addgene Blog. Apr 3, 2014.
- [86] Xia, W., Bringmann, P., McClary, J., Jones, P. P., Manzana, W., Zhu, Y., ... & McLean, K. High levels of protein expression using different mammalian CMV promoters in several cell lines. *Protein expression and purification*. 2006; 45(1), 115-124.
- [87] Zarrin AA, Malkin L, Fong I, Luk KD, Ghose A, Berinstein NL. Comparison of CMV, RSV, SV40 viral and  $\lambda$ 1 cellular promoters in B and T lymphoid and non-lymphoid cell lines. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*. 1999 Jul 7;1446(1-2):135-9.
- [88] Barrow KM, Perez-Campo FM, Ward CM. Use of the cytomegalovirus promoter for transient and stable transgene expression in mouse embryonic stem cells. In *Embryonic Stem Cell Protocols 2006* (pp. 283-294). Humana Press.
- [89] Smith RL, Traul DL, Schaack J, Clayton GH, Staley KJ, Wilcox CL. Characterization of promoter function and cell-type-specific expression from viral vectors in the nervous system. *Journal of virology*. 2000 Dec 1;74(23):11254-61.
- [90] Boulos S, Meloni BP, Arthur PG, Bojarski C, Knuckey NW. Assessment of CMV, RSV and SYN1 promoters and the woodchuck post-transcriptional regulatory element in adenovirus vectors for transgene expression in cortical neuronal cultures. *Brain research*. 2006 Aug 2;1102(1):27-38.

- [91] González E, Montañez C, Ray PN, Howard PL, García-Sierra F, Mornet D, Cisneros B. Alternative splicing regulates the nuclear or cytoplasmic localization of dystrophin Dp71. *FEBS letters*. 2000 Oct 6;482(3):209-14.
- [92] Kobayashi M, Taniura H, Yoshikawa K. Ectopic expression of necdin induces differentiation of mouse neuroblastoma cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2002 Nov 1;277(44):42128-35.
- [93] Mie M, Endoh T, Yanagida Y, Kobatake E, Aizawa M. Induction of neural differentiation by electrically stimulated gene expression of NeuroD2. *Journal of biotechnology*. 2003 Feb 13;100(3):231-8..
- [94] Ishii T, Furuoka H, Muroi Y, Nishimura M. Inactivation of integrin-linked kinase induces aberrant tau phosphorylation via sustained activation of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  in N1E-115 neuroblastoma cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2003 Jul 18;278(29):26970-5.
- [95] Muroi Y, Ishii T. Umami taste receptor functions as an amino acid sensor via G $\alpha$ s subunit in N1E-115 neuroblastoma cells. *Journal of cellular biochemistry*. 2012 May;113(5):1654-62.
- [96] ThermoFisher Scientific. Best Practices for DNA Transfection. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/pe/en/home/life-science/cell-culture/transfection/transfection-support/transfection-tips-and-tricks.html>
- [97] ThermoFisher Scientific. Factor Influencing Transfection Efficiency. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/pe/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/transfection-basics/factors-influencing-transfection-efficiency.html>.
- [98] Liu C, Dalby B, Chen W, Kilzer JM, Chiou HC. Transient transfection factors for high-level recombinant protein production in suspension cultured mammalian cells. *Molecular biotechnology*. 2008 Jun 1;39(2):141-53.
- [99] Smith MA, Schnellmann RG. Calpains, mitochondria, and apoptosis. *Cardiovascular research*. 2012 May 11;96(1):32-7.

[100] Gafni J, Hermel E, Young JE, Wellington CL, Hayden MR, Ellerby LM. Inhibition of calpain cleavage of huntingtin reduces toxicity accumulation of calpain/caspase fragments in the nucleus. *Journal of Biological Chemistry*. 2004 May 7;279(19):20211-20.